

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1966 - N° 527

TITRE DE LA THÈSE

ÉTUDE DU DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE
DE LA GRIPPE A VIRUS A2
AU COURS D'UNE ÉPIDÉMIE

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie de LYON

le 30 Juin 1966

par

Janez ZAJC

né le 22 Juin 1934

à LJUBLJANA (Yougoslavie)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552626_0032

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1966 - N° 527

TITRE DE LA THÈSE

ÉTUDE DU DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE
DE LA GRIPPE A VIRUS A2
AU COURS D'UNE ÉPIDÉMIE

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie de LYON

le 30 Juin 1966

par

Janez ZAJC

né le 22 Juin 1934

à LJUBLJANA (Yougoslavie)

1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200 2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240 2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260 2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280 2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300 2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320 2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340 2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360 2361 2362 2363 2364 2365 2366 2367 2368 2369 2370 2371 2372 2373 2374 2375 2376 2377 2378 2379 2380 2381 2382 2383 2384 2385 2386 2387 2388 2389 2390 2391 2392 2393 2394 2395 2396 2397 2398 2399 2400 2401 2402 2403 2404 2405 2406 2407 2408 2409 2410 2411 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419 2420 2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429 2430 2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440 2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2451 2452 2453 2454 2455 2456 2457 2458 2459 2460 2461 2462 2463 2464 2465 2466 2467 2468 2469 2470 2471 2472 2473 2474 2475 2476 2477 2478 2479 2480 2481 2482 2483 2484 2485 2486 2487 2488 2489 2490 2491 2492 2493 2494 2495 2496 2497 2498 2499 2500 2501 2502 2503 2504 2505 2506 2507 2508 2509 2510 2511 2512 2513 2514 2515 2516 2517 2518 2519 2520 2521 2522 2523 2524 2525 2526 2527 2528 2529 2530 2531 2532 2533 2534 2535 2536 2537 2538 2539 2540 2541 2542 2543 2544 2545 2546 2547 2548 2549 2550 2551 2552 2553 2554 2555 2556 2557 2558 2559 2560 2561 2562 2563 2564 2565 2566 2567 2568 2569 2570 2571 2572 2573 2574 2575 2576 2577 2578 2579 2580 2581 2582 2583 2584 2585 2586 2587 2588 2589 2590 2591 2592 2593 2594 2595 2596 2597 2598 2599 2600 2601 2602 2603 2604 2605 2606 2607 2608 2609 2610 2611 2612 2613 2614 2615 2616 2617 2618 2619 2620 2621 2622 2623 2624 2625 2626 2627 2628 2629 2630 2631 2632 2633 2634 2635 2636 2637 2638 2639 2640 2641 2642 2643 2644 2645 2646 2647 2648 2649 2650 2651 2652 2653 2654 2655 2656 2657 2658 2659 2660 2661 2662 2663 2664 2665 2666 2667 2668 2669 2670 2671 2672 2673 2674 2675 2676 2677 2678 2679 2680 2681 2682 2683 2684 2685 2686 2687 2688 2689 2690 2691 2692 2693 2694 2695 2696 2697 2698 2699 2700 2701 2702 2703 2704 2705 2706 2707 2708 2709 2710 2711 2712 2713 2714 2715 2716 2717 2718 2719 2720 2721 2722 2723 2724 2725 2726 2727 2728 2729 2730 2731 2732 2733 2734 2735 2736 2737 2738 2739 2740 2741 2742 2743 2744 2745 2746 2747 2748 2749 2750 2751 2752 2753 2754 2755 2756 2757 2758 2759 2760 2761 2762 2763 2764 2765 2766 2767 2768 2769 2770 2771 2772 2773 2774 2775 2776 2777 2778 2779 2780 2781 2782 2783 2784 2785 2786 2787 2788 2789 2790 2791 2792 2793 2794 2795 2796 2797 2798 2799 2800 2801 2802 2803 2804 2805 2806 2807 2808 2809 2810 2811 2812 2813 2814 2815

Doyens honoraires :

M. J. LEPINE - Membre de l'Institut

M. H. HERMANN - Correspondant de l'Institut

Doyen : M. J.F. CIER

Assesseeurs : M. M. LEVRAT

M. L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PATEL - LEPINE - TRILLAT - MOURIQUAND - GARIN - GATE -
MARTIN - GABRIELLE - SANTY - DUCLOS - GUILLEMINET -
HERMANN - ROCHET - POLOSSON - ENSELINE - WERTHEIMER -

PROFESSEURS

MM. CIBERT	Clinique Urologique
PONTHUS (Détaché à Beyrouth)	Physique biologique
DECHAUME	Clinique Neuro-psychiatrique et d'Hygiène mentale
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires
CROIZAT	Clinique médicale C
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
REVOL	Pharmacie galénique
PIGEAUD	Clinique obstétricale
BOURRET	Médecine du travail
LEVRAT	Clinique médicale A
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale
NETIEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie
ROCHE	Médecine légale et déontologie
COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique

MM. MOUNIER-KHUN

PAUFIQUE
THIERS

BRUN
CREYSSEL

DARGENT
GUICHARD
GIRARD Paul
LATARJET
PEYCELON
GIRARD Marcel
VACHON
GALY

PAPILLON
JEUNE

GONIN
MONNET
BANSSILLON
CHATONNET
GUINET
TRILLAT
FREIDEL
MARION Joseph

DORCHE

DUMONT Louis
PERROT
CIER J.F.
PERRIN J.

MICHAUD Pierre
MATHIEU
FAUCON
BERTOYE
VIGNON
CIER André
VINCENT D.

X.....
X.....
X.....
X.....

Clinique d'Oto-Rhino-laryngologie et
d'audio-phonologie
Clinique ophtalmologique
Clinique de dermatologie, syphiligra-
phie et allergologie
Clinique de pneumo-phtisiologie
Clinique chirurgicale orthopédique et
traumatologique
Clinique carcinologique
Anatomie pathologique
Pathologie générale et expérimentale
Anatomie
Pathologie chirurgicale
Clinique médicale D
Pathologie médicale
Physio-pathologie des voies respi-
ratoires
Radiologie
Clinique médicale infantile et
hygiène du 1er âge
Thérapeutique
Bactériologie
Physiologie et pathologie obstétricales
Physiologie B
Clinique endocrinologique
Clinique de chirurgie orthopédique
Clinique stomatologique
Clinique de chirurgie et d'orthopédie
infantiles
Matière médicale et législation phar-
maceutique
Histologie et embryologie
Chimie
Physiologie A
Thérapeutique chirurgicale et chirur-
gie opératoire
Clinique de chirurgie cardiaque
Clinique gynécologique
Biologie médicale et pharmacodynamie
Clinique des maladies infectieuses
Hydrologie
Pharmacodynamie
Biochimie appliquée

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM. BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine
MAINSUY	Neuro-chirurgie
COLLET	Chimie générale et pharmaceutique
LACROIX	Hygiène et climatologie
LIARAS	Clinique chirurgicale propédeutique
LECUIRE	Neuro-chirurgie
REVOL	Médecine générale
GOINARD	Thérapeutique chirurgicale
PONT Maurice	Médecine générale
TRAEGER	Pathologie métabolique et rénale

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. ROMAN	Parasitologie
FEROLDI	Anatomie pathologique
MORET	Physique biologique
ODDOUX	Botanique et cryptogamie
de SOLLIERS	Chimie analytique
DESPIERRES	Médecine générale
GARIN	Parasitologie
TOLOT	Médecine du travail
THIVOLET	Hygiène

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

MM. CREYSSEL Roger	Chimie biologique
PINET	Electro-radiologie
GUYOTAT	Neuro-psychiatrie
DESCOTES	Chirurgie générale
JOUVET	Pathologie expérimentale
PEYRIN	Physique biologique
TOMLISI	Anatomie pathologique
BUFFARD	Electro-radiologie
LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique
de MOURGUES F.	Stomatologie
NAUSSAC	Maladies infectieuses
REBOUILLET	Chirurgie générale
ROMAGNY	Pédiatrie
DEMLHAYE	Médecine générale
DEMEUZE	Anesthésiologie

MM. GIRAUD

MICHEL
FRANCOIS
MICHOUILLIER
COLOMB
LAMBERT
FRIES
GILLY
ROBERT
BOUCHET
BETHENOD
GERMAIN
KALB
LARBRE
SOUSTELLE
VIALA
VINCENT
GIROD
GRAS
MALLEIN
COLIN
BERTRAND
MARET
VIALLER-RAYNARD
CHOLLAT
FLEURETTE

Electro-radiologie diagnostic et
thérapeutique
Anesthésiologie
Pédiatrie et Puériculture
Chirurgie générale
Dermatologie
Médecine générale
Médecine générale
Pédiatrie
Médecine générale
Anatomie
Pédiatrie
Immunologie, sérologie, hématologie
Pneumo-phthisiologie
Pédiatrie
Chirurgie générale
Médecine générale
Bactériologie, parasitologie, virologie
Histologie et embryologie
Chimie biologique
Chimie analytique
Médecine légale
Chimie biologique
Chirurgie générale
Bactériologie
Electro-radiologie
Bactériologie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

FAVRE-GILLY
RIFFAT
FLANDROIS
ROLLET

Hématologie
Hygiène
Physiologie
Pharmacie galénique

AGREGES EN EXERCICE

MARION Pierre
BONMOUR
de MOURGUES Georges
DEVIC
DUMONT Martial

Chirurgie générale
Ophtalmologie
Chirurgie générale
Médecine générale
Obstétrique

MM. DURAND	Urologie
FRANCIILLON	Chirurgie générale
SAUBIER	Chirurgie générale
SCHOTT	Neuro-Psychiatrie
ALLEGRE	Neuro-chirurgie
CHASSARD	Electro-radiologie
FLYSSE	Orthopédie
GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie
GARDE	Médecine générale
HUGONNIER	Ophtalmologie
MORNEX	Médecine générale
MOUNIER-KUHN Alain	Chirurgie générale
NORLAND	Médecine générale
PERRIN André	Médecine générale
DULIS	Stomatologie
GARMIER	Obstétrique
NOEL	Médecine générale
SCHNEPP	Orthopédie
NOTTER	Gynécologie obstétricale

Examineurs de la thèse :

Président : M. le Professeur R. SOHIER

Assesseurs : MM. BOUCHERLE

DORCHE

THIVOLET

A MON FILS

A MA FEMME

A MES PARENTS et BEAUX PARENTS

A MON FRERE

ET A TOUS MES AMIS

A MONSIEUR LE DOCTEUR CH. MERIEUX

Avec mes très sincères remerciements
pour toute l'aide qu'il a bien voulu m'accorder
et avec ma très profonde reconnaissance pour la
confiance qu'il m'a toujours témoignée.

A MON MAÎTRE et PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. SOHIER

Avec mes très sincères remerciements
pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, m'y
avoir initié à la virologie et me l'avoir fait aimer.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. BOUCHERLE

de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Grenoble

Avec mes très sincères remerciements
pour avoir accepté de faire partie de mon jury en
souvenir de notre première rencontre.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. DORCHE

qui m'a fait l'honneur d'accepter de
faire partie du jury de ma thèse.

En hommages respectueux.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. THIVOLET '

qui a bien voulu être membre de mon jury.

Avec mes très sincères remerciements.

A TOUS MES PROFESSEURS ET A TOUS MES COLLEGUES

DES FACULTES DE PHARMACIE DE LJUBLJANA et ZAGREB.

A TOUT LE PERSONNEL DU LABORATOIRE D'HYGIENE
AUPRES DUQUEL J'AI TOUJOURS TROUVE UN BON ACCUEIL
ET QUE JE REMERCIE DE M'AVOIR AIDE DANS MON
TRAVAIL.

INTRODUCTION

Après la disparition des grandes maladies pestilentiennes (peste, choléra, typhus) et la rétrocession notable de la variole, la grippe reste la seule maladie pandémique pouvant diffuser assez rapidement sur la totalité du globe, ainsi que l'a prouvé, pour ne citer que les épidémies récentes, celle survenue en 1957.

On sait, qu'en dehors des phases pandémiques, surviennent des épidémies, dites interpandémiques. C'est ainsi que le virus A_2 , après la pandémie de 1957, a donné lieu à un certain nombre d'épidémies plus ou moins étendues. Elles ont été observées en France, en 1960, 1962, 1963, 1965.

La plus importante d'entre elles a été observée en 1965, en particulier en Europe.

Le Centre National de la Grippe ayant, comme d'ailleurs pour toutes les épidémies précédentes, procédé à des recherches sur l'étiologie de cette épidémie, le Professeur R. SOHIER nous a demandé de procéder à une étude aussi complète que possible

des méthodes biologiques ayant permis l'isolement, l'identification des souches et les réactions sérologiques.

Notre étude comportera essentiellement :

Tout d'abord, une étude de l'évolution de la grippe dite "asiatique" en France et dans le monde.

Puis, une étude sur les modalités de prélèvements et d'envoi au laboratoire des produits pathologiques.

Les procédés d'isolement et d'identification des souches.

Un chapitre concernant les études sérologiques.

Ces chapitres sont suivis des conclusions que l'on peut tirer de ces résultats obtenus.

ORGANISATION SANITAIRE CONCERNANT LA GRIPPE

I - dans le monde : O M S

II - en FRANCE : A - Décret n° 71 b

- 1) Laboratoires destinataires
- 2) Prélèvements en vue du diagnostic par
isolement d'un virus
- 3) Par les méthodes sérologiques

B - en pratique

EVOLUTION DE L'EPIDEMIE DE GRIPPE DANS LE MONDE ET EN FRANCE

I - Dans le monde

- a) Données épidémiologiques et géographiques
- b) Types de virus en cause
- c) Conclusions

II - En France

- a) Données épidémiologiques et géographiques
- b) Types de virus en cause
- c) Conclusions

I - Dans le monde

1) Centres internationaux ou mondiaux

Depuis sa création, l'organisation mondiale de la santé a continuellement porté de l'intérêt aux recherches sur les Viroses. Dans cette optique l'O M S créa en 1947 le premier centre international de la grippe à Londres au National Institute for Medical Research. Ce centre groupe actuellement 61 laboratoires participants.

Par la suite un centre international O M S de la grippe pour les Amériques fut établi à Atlanta (Georgie) aux Etats-Unis. Il compte, lui, 57 laboratoires participants.

Leur tâche consiste à obtenir le plus vite possible les virus grippaux récemment isolés pour pouvoir dépister les souches responsables et leurs nouvelles mutations antigéniques s'il y a lieu.

De plus ils doivent posséder une collection complète des types de virus et des sérums spécifiques pour l'identification de ces virus ou d'autres virus pouvant présenter des ressemblances antigéniques.

Il leur est enfin confié la mission de stimuler les recherches et de faciliter la formation de chercheurs.

2°) Centres régionaux

Sur l'avis des directeurs des centres internationaux et des experts de l'O M S, des centres régionaux ont été choisis. Ils travaillent en étroite collaboration, d'une part avec les centres internationaux, d'autre part avec les laboratoires nationaux. Leurs principales fonctions sont au nombre de six :

1°) Identification des souches isolées dans la région qui est du ressort d'un centre lorsque l'identification ne peut se faire dans le laboratoire national approprié.

2°) Entretien et distribution aux laboratoires nationaux compétents de souches prototypes des virus les plus fréquents dans la région, à moins qu'une telle distribution de souches ne risque de propager des infections à des zones jusque là indemnes.

3°) Préparation et essai des antisérums pour l'identification des virus et distribution des réactifs de référence et des réactifs pratiques aux laboratoires compétents.

4°) Avis de consultant à l'intérieur de la région ; avis et assistance pendant une épidémie et sur demande.

5°) Rassemblement, interprétation et transmission à l'O M S de toutes les informations épidémiologiques obtenues au cours des activités de référence du centre.

6°) Formation de virologistes.

5) Laboratoires nationaux

Les laboratoires nationaux de référence pour les virus, à la différence des centres mondiaux et régionaux, ne sont pas désignés par l'O M S et ne reçoivent pas de subventions de cet organisme. L'étendue et la nature de leurs activités dépendent de décisions nationales mais ils assument dans le pays dont ils dépendent les mêmes fonctions que le centre régional O M S de référence dans une région.

II - Organisation sanitaire en FR HCE

A - Circulaire n° 71 b du 11.IX.57

La circulaire n° 71 b du 11.IX.57 transmise aux préfets et aux directeurs départementaux de la Santé règle en France les conditions dans lesquelles doivent être effectués les prélèvements ainsi que leur transport.

Par une lettre du 2 Février 1965, le Directeur général de la Santé Publique, au nom du Ministre rappelait ces différentes mesures permettant de déceler ... "toute manifestation épidémique.... d'en préciser l'extension, les caractéristiques cliniques et les mesures prophylactiques instituées".

1 - Laboratoires destinataires

Deux laboratoires ont été désignés par l'organisation mondiale de la santé (O M S) : l'un pour la moitié Sud : La section de virologie du Laboratoire National de la Santé publique à Lyon, l'autre pour la moitié Nord : l'Institut Pasteur de Paris.

Les prélèvements ne doivent pas être faits uniquement en périodes épidémiques mais également interépidémiques.

2 - Prélèvements en vue du diagnostic par isolement d'un virus

Les prélèvements devront être faits le plus rapidement possible après l'apparition des premiers symptômes de la maladie à partir des sécrétions nasales et pharyngées et éventuellement laryngo trachéo-bronchiques. On pourra procéder soit à l'écouvillonnage de la gorge soit au lavage du pharynx.

a) Ecouvillonnage de la gorge :

Il sera fait avec un tampon de coton hydrophile ou cardé monté sur une tige de bois et contenu dans un tube stérile. Le prélèvement devra contenir le plus possible de mucosités ou de produits pathologiques. L'écouvillon peut être alors soit remis dans le tube stérile, soit immergé dans un milieu assurant une meilleure conservation (5 ml d'eau distillée, additionnée de 20 % de bouillon ordinaire et de 10 000 unités de pénicilline.

b) Lavage de gorge

Il est apparu préférable d'utiliser de l'eau distillée stérile, seule ou additionnée de 5 à 10 % de bouillon ordinaire au lieu d'eau physiologique qui s'est avérée peu compatible

avec la conservation du virus vivant. Le gargarisme pratiqué en trois ou quatre fois avec chaque fois 5 ml de liquide devra contenir comme précédemment le plus de mucosités ou de sécrétions possible. Il sera recueilli dans un flacon stérile à fermeture hermétique.

c) Envoi au laboratoire

Les prélèvements devront être mis dans des ampoules scellées ou dans des récipients convenablement bouchés et contenus de préférence dans des boîtes métalliques. Chaque prélèvement devra porter une étiquette mentionnant :

- la provenance
- l'identité du malade
- la date de prélèvement
- le nombre de jours écoulés entre le début de la maladie et le jour du prélèvement
- quelques indications sur les symptômes cliniques déjà constatés.

Le virus grippal étant fragile, le décret précise dans quelles conditions les prélèvements devront être acheminés au laboratoire (avant le transfert : conservation au réfrigérateur ou au congélateur, au moment du transport placés dans des boîtes isothermes construites spécialement à cet effet).

Il peut être demandé au laboratoire national d'envoyer sur place une personne qualifiée et habituée à faire des prélèvements et à assurer leur transport dans des conditions convenables.

3 - Prélèvements en vue du diagnostic par les méthodes sérologiques

- a) Date des prélèvements par rapport au début de la maladie

Pour pouvoir déceler une apparition ou une augmentation des anticorps deux prélèvements devront être effectués :

- 1 - Entre le premier jour de la maladie et le quatrième
- 2 - Entre le huitième et le dixième jour

Si l'on ne possède que le deuxième prélèvement on ne pourra pratiquer que la réaction de fixation du complément, ce qui permettra d'infirmer ou de confirmer la présence d'un état infectieux d'après le taux d'anticorps trouvés.

Si l'on possède les deux sérums il sera pratiqué la réaction d'inhibition d'hémagglutination qui permettra d'établir un véritable diagnostic sérologique de la grippe.

- b) Récolte du sang ou du sérum :

On devra prendre entre 5 et 10 cc du sang qui sera prélevé et recueilli dans un matériel stérile.

c) Envoi au laboratoire :

On peut faire parvenir au laboratoire soit le sang, soit le sérum. Si quelque attente devait se produire avant l'envoi au laboratoire, le prélèvement serait conservé au réfrigérateur à 4°C.

Comme précédemment, ces prélèvements devront être étiquetés et porter toutes les indications nécessaires.

B - Technique de prélèvement utilisée par la
section de Virologie du Laboratoire National
de la Santé Publique à Lyon.

1) Prélèvement en vue du diagnostic par isolement
du virus :

Les prélèvements devront être faits dans la mesure
du possible dans les trois premiers jours qui suivent le
début de la maladie, bien qu'une étude systématique ait révélé
qu'il était encore possible d'isoler le virus grippal A
jusqu'au neuvième jour après le début de l'infection.

Actuellement l'écouvillonnage de la gorge est pré-
féré au lavage, car les résultats ont démontré que cette pre-
mière méthode donnait davantage de résultats positifs. Cela
tient sans doute au fait que l'écouvillonnage est d'exécution
plus facile et qu'il entraîne une moindre dilution des secré-
tions parfois inhibitrices des produits contenant le virus.
Dans certains cas (nourrissons, ou même adultes), il est néces-
saire de procéder par aspiration des mucosités à la sonde.

a) Prélèvements hors de Lyon

Nous utilisons un écouvillon constitué par un tampon
de coton cardé monté sur une tige de bois et contenu dans un

tube stérile. Après avoir prélevé le maximum de mucosités ou de produits pathologiques présents dans la gorge, l'écouvillon est, soit remis dans le tube stérile, soit, plus généralement immergé dans un flacon contenant le milieu de transport après que la tige de bois ait été cassée au niveau du coton. Le flacon est alors bouché avec un bouchon à vis et agité vivement.

Flacon : On utilise des flacons en verre normalisé de 60 ml de contenance à bouchon à vis de 20 mm de diamètre. Leur aspect extérieur rappelle celui des flacons de Roux ayant 100 mm de hauteur et une base de 40 mm x 25 mm. Le flacon ayant été stérilisé (au four, 2 H à 80°), on met 3 ml de milieu de transport de Taylor également stérile :

b) Prélèvements dans les hôpitaux pédiatriques de Lyon
(clinique mutualiste ; Hôpital Debrousse ; Hôpital Edouard Herriot)

On utilise, soit des tubes de culture, soit ces mêmes flacons mais contenant une culture cellulaire ainsi que le milieu de survie correspondant. L'écouvillon est alors immergé dans le milieu et agité puis enlevé.

Milieu de transport de Taylor :

Ce milieu comprend trois composants différents :

Formules :

Solution de Hanks 90 ml
Albumine bovine 30 % Armour . 6,6 ml : 2 %
Bicarbonate de sodium 4,4 % . 5,4 ml : 0,13 %

I - Solution de HANKS 10 fois concentrée

1) NaCl 80 g
KCl 4 g
Mg SO₄ 7H₂O 1 g
Mg Cl₂ 6H₂O 1 g
Eau permutée 400 ml

2) Na₂ HPO₄ 0,6 g
KH₂ PO₄ 0,6 g
eau permutée 250 ml

3) CaCl₂ 1,4 g
eau permutée 200 ml

4) Glucose 10 g
eau permutée 100 ml

5) rouge de phénol 0,1 g
eau permutée 50 ml

Mélanger ces 5 solutions et compléter à 1100 ml avec de l'eau permutée. Stériliser par filtration. Conserver à 4°C.

Au moment de l'emploi, diluer au 1/10ème. On obtient la solution Hanks normale.

II - Albumine bovine 30 % ARMOUR

Solution à 30 % en eau permutée. Dissoudre à froid. Centrifuger. Stériliser par filtration. Conserver à - 20°C.

III - Bicarbonate de sodium à 4,4 %

Solution en eau permutée. Stériliser par filtration. Conserver à la température du laboratoire.

Le milieu final doit avoir un pH d'environ 7,2. Il doit être conservé à 4°C.

On mélange stérilement les trois solutions précédentes stérilisées par filtration.

Culture cellulaire : On peut utiliser différentes cultures cellulaires :

- en lignée continue : K B ; Hep ; cellules anniotiques

- en primo -cultures : reins de singe (Vervet, cynomolgus baboins).

:
Cellules :
: en : Milieux de survie :
lignées :
:continues: :

:
K B :
: - Hydrolysate de lactalbumine (en solution dans de :
: l'eau distillée) 94,7 ml :
:- Sérum de veau à 2 % 2 ml :
:- Bicarbonate de sodium à 3,92 % rouge de Phénol 3,3 ml :
:- Pénicilline (100 unités pour 1 ml milieu final 0,1 ml :
: pour 100 ml milieu final : pénicilline diluée :
: dans 100 ml) :
:- Streptomycine (50 mg pour 1 ml milieu final 0,05 ml :
: pour 100 ml milieu final : streptomycine diluée :
: dans 10 ml). :

:
H E P :
: - Hydrolysate de lactalbumine en solution dans Hanks 0,5 % :
:- sérum de veau 5 % :
:- Bicarbonate de sodium à 3,92 % rouge de Phénol . 4 % :
: : : : :

: Cellules:
amnio- - Sérum de veau 2 ml :
tiques :
- Milieu de Parker Q.S.P. 100 ml :
: :

: Cellules :
de reins - Milieu de Parker :
de singe :

Transport et conservation :

Congélation :

La nature des virus grippaux étant éminemment fragile, des précautions devront être prises pendant le transport des prélèvements et leur conservation. Pour ceci on utilisera non seulement des milieux appropriés mais on devra faire parvenir les prélèvements au laboratoire dans les plus brefs délais et si non procéder à leur congélation.

Au cas où le prélèvement ne parviendrait pas dans les quatre heures au laboratoire (et dans ce cas maintenu à 4°), après avoir été effectué, il devra être congelé suivant les moyens dont on dispose sur place :

- congélateurs de réfrigérateurs ménagers
(-7 à - 12°)
- glacières de pâtisseries, bouchers, etc...
(- 15 à - 25°)
- réfrigérateurs électriques ou mélanges
réfrigérants (alcool éthylique ou méthylique
plus neige carbonique) (-50° à - 70°)

Ces derniers moyens permettent d'obtenir une conservation de deux à trois jours et en conséquence d'acheminer un prélèvement par courrier postal.

- Fiche d'envoi : Une fiche d'envoi devra nécessairement accompagner le prélèvement et porter le maximum d'indications s'y rapportant. Un double devra être envoyé par lettre séparée au laboratoire mentionnant, le cas échéant, les détails supplémentaires ou les recherches demandées.

- Expédition : Elle sera effectuée soit par un convoyeur, soit par poste. Il est plus aisé de faire parvenir le prélèvement par un convoyeur qui peut assurer un transport plus rapide et s'assurer à tout moment que le prélèvement se trouve dans de bonnes conditions (bouteilles isothermes contenant de la glace ou de la neige carbonique).

Pour les envois par poste, il est nécessaire d'utiliser un système réfrigérant et un boitage imperméable et protecteur.

Prélèvement en vue du diagnostic par les méthodes sérologiques :

Pour que le diagnostic soit valable, les prélèvements devront être effectués pour le sérum précocement le troisième jour et pour le sérum tardif entre le septième et le dixième jour après le début de la maladie.

Il suffit de prélever par ponction veineuse quelques ccm (5 ml) de sang dans un tube ou dans un flacon stérile.

Il faudra éviter dans la mesure du possible d'envoyer le prélèvement sanguin par poste et de laisser un intervalle supérieur à 36 heures s'écouler entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire, en particulier si la température est supérieure à 18°.

Au cas où la distance ou la température ne permettraient pas le transport du sang total, on devrait centrifuger le sang et récolter le sérum. Pour le transport, le sérum peut être envoyé tel quel au laboratoire dans les plus brefs délais (tube stérile et boîte métallique). Mais l'idéal serait de procéder à la congélation, ou mieux à la lyophilisation sur place du sérum. De même que pour les prélèvements de gorge, les prélèvements de sang ou de sérum devront être accompagnés de leur fiche respective.

EVOLUTION DE L'EPIDEMIE DE GRIPPE DANS LE MONDE

ET EN FRANCE

I - Dans le monde :

Le "Relevé épidémiologique hebdomadaire" publié par l'O M S (1965, 40, 335-380) publie des données épidémiologiques et géographiques concernant 23 pays atteints par la grippe pendant la saison 64-65.

a) Données épidémiologies et géographiques

AMERIQUE : Aux Etats-Unis la grippe commença fin Décembre 1964 et se prolongea jusqu'à la fin Mars 1965. Elle débuta dans les états Nord-est et s'étendit à la majeure partie du pays. C'était là le coup d'envoi de la saison de grippe pour l'année 1965. L'épidémie se prolongea au Canada (mi-février - mi-mars 1965) mais resta fortement localisée, comme le prouvent les différentes souches isolées.

Pendant les trois dernières semaines de mars, une épidémie de moyenne importance se déclara au Vénézuéla.

Au mois d'Avril elle apparut au Brésil dans le seul état de Guanabara.

L'ÉPIDÉMIE DE LA GRIPPE DANS LE MONDE 1965

Grippe Type A	— + — + — +	Grippe type C	-----
Grippe Type B	: : : : :	non identifié	=====

Pays	Déc. 1964	Janvier 1965	Février 1965	Mars 1965	Avril 1965
U.S.A.	+	+	+	+	+
BRESIL	+	+	+	+	+
CANADA	+	+	+	+	+
VENEZUELA	+	+	+	+	+
HONG-KONG	+	+	+	+	+
JAPON	+	+	+	+	+
MONGOLIE	+	+	+	+	+
ALLEMAGNE DE L'EST	+	+	+	+	+
BULGARIE	+	+	+	+	+
DANEMARK	+	+	+	+	+
FINLANDE	+	+	+	+	+
FRANCE	+	+	+	+	+
HONGRIE	+	+	+	+	+
NORVEGE	+	+	+	+	+
PAYS-BAS	+	+	+	+	+
POLOGNE	+	+	+	+	+
R.F. ALLEMAGNE	+	+	+	+	+
ROUMANIE	+	+	+	+	+
ROYAUME UNI	+	+	+	+	+
SUEDE	+	+	+	+	+
SUISSE	+	+	+	+	+
U.R.S.S.	+	+	+	+	+
AUSTRALIE	+	+	+	+	+

ASIE : En Asie, des épidémies sporadiques et de légère morbidité atteignirent le Japon et Hong-Kong respectivement de la mi-Janvier à la mi-février et de la mi-février à la mi-avril. Mais une épidémie d'allure grippale (sans confirmation de laboratoire) commença dans la partie Nord de la Mongolie à la mi-février et s'étendit vers le sud en passant par Oulanbator. Elle prit fin avec les derniers jours de mars.

EUROPE : L'épidémie fût surtout de forte intensité et de grande extension en Europe orientale. En Europe de l'Ouest elle fût le plus généralement de moyenne intensité. Les premières constatations furent faites simultanément en Angleterre, en Allemagne de l'est et en U.R.S.S. au mois de Janvier. Alors qu'elle ne dura qu'un mois en Allemagne de l'est (nombreuses épidémies sporadiques vers la côte baltique), elle se termina à la fin mars en Angleterre, où elle se manifesta presque uniquement dans le sud du pays.

U.R.S.S. : L'épidémie ne dura que deux mois, mais elle s'étendit à tout le pays. Les premiers cas furent déclarés à Leningrad puis vers la deuxième décade de Janvier à Moscou et dans la partie européenne de l'U.R.S.S. et en Estonie. L'Est et le Centre furent atteints à la fin Janvier, le Sud ainsi que les territoires traversés par le Transsibérien le furent en Février.

FRANCE : Des foyers épidémiques se déclarèrent dans tout le pays de la mi-Janvier au début Avril, mais restèrent limités à des communautés (écoles, hospices). Seules quelques villes furent moyennement touchées. L'épidémie de grippe en France faisant l'objet principal de notre thèse, nous y reviendrons en détail dans la seconde moitié de ce chapitre.

PAYS SCANDINAVES : Dès le début du mois de Février, la Finlande, la Suède et la Norvège furent touchées par la grippe.

FINLANDE : 25 % de la population de Helsinki fut touchée ainsi que 35 % de l'armée. Cette vaste épidémie commencée à l'Est et au Sud de la Finlande se propagea à l'Est et au Sud.

SUEDE : De même qu'en Finlande, l'épidémie déclarée au début Février et terminée à la fin de Mars, prit une très large extension : d'abord à Stockholm, dans les régions côtières du Nord et dans la région sud de la côte est puis à l'ensemble du pays.

NORVEGE : L'épidémie qui dura du début Février à la mi-Mars prit une moyenne extension dans de nombreux endroits

du pays, en particulier sur la côte occidentale. A Oslo la morbité augmenta en Mars.

POLOGNE : Pendant ce temps, c'est-à-dire du début Février au début Mars, de vastes épidémies se déclarèrent à Varsovie (plus de 165 000 cas) et dans la province de Gdansk (plus de 55 000 cas).

HONGRIE : Une très grande épidémie se déclara dans la deuxième semaine de Février dans le sud du pays. Elle atteignit le nord au début Mars et affecta dès lors l'ensemble du pays puisque plus de 10 % de la population totale fut touchée surtout à Budapest et dans les grandes villes.

DANEMARK : Avec un léger retard sur les autres pays scandinaves l'épidémie de grippe se déclara au Danemark à la mi-Février, mais s'y prolongea, comme en Finlande, jusqu'à la mi-Avril. Elle y prit une moyenne extension. Commencée dans la capitale et ses environs, elle atteignit l'ensemble du pays avec une intensité variable.

PAYS-BAS : Des cas sporadiques furent déclarés en Hollande de la mi-Février à la fin Mars. Furent touchées en premier des unités militaires, puis une faible partie de la

population civile, sauf à Den Helder dans le nord du pays où l'épidémie prit une ampleur moyenne.

ROUMANIE : Vers la fin Février, une vague épidémique d'ampleur moyenne se déclara. Elle fut concomittente avec d'autres épidémies dues à des virus non grippaux. On déclara 5 à 15 ‰ de morbidité dans des camps militaires et dans les écoles.

BULGARIE : Il n'y eut que deux épidémies locales à Kasanlik et à Isperihovo pendant le mois de Mars.

R.F. D'ALLEMAGNE : Du début Mars à la mi-Avril quelques petites épidémies eurent lieu dans la région de Hanovre, puis en Basse-Saxe. La morbidité fut plus importante à Hambourg et dans le Nord-Est du pays.

SUISSE : Une épidémie à morbidité relativement importante fut notifiée par tous les cantons à l'exception des cantons d'Unterwald et d'Appenzell.

OCEANIE : De Janvier à Mars une vaste épidémie se déclara dans tout le territoire de Papoua et en Nouvelle Guinée. Elle eut des répercussions graves, surtout dans les communautés primitives.

b) - Types de virus en cause :

D'après le tableau ci-joint, nous pouvons voir la prépondérance presque exclusive (21 fois sur 23) du virus de type A₂. Ceci a été prouvé non seulement par les diagnostics sérologiques, mais également par l'isolement des virus. Du point de vue clinique les épidémies à virus A₂ se révélèrent le plus souvent bénignes, si ce n'est en Hongrie où la maladie s'accompagna d'une longue convalescence et de complications. On doit noter la présence d'infections à adenovirus ou à étiologie inconnue au Danemark, en Finlande et au Suède.

En ce qui concerne le virus de type B, il fut décelé une seule fois comme étant l'unique responsable, et ceci en Australie. A ce sujet on peut remarquer que ce même virus B avait été mis en évidence par la sérologie dans les états d'Australie orientale ainsi que dans l'état de "South Australia" pendant les quatre derniers mois de 1964.

Des virus de type B furent retrouvés en parallèle avec le virus de type A₂ aux Etats-Unis, au Danemark, en France, aux Pays-Bas et en Angleterre, mais son importance reste le plus souvent secondaire.

La plus grande variété de types de virus se rencontre au Danemark. Bien que le seul type de virus isolé ait été celui de type A_2 , la sérologie fait état de l'existence de virus de type B et C. C'est la seule fois où l'on parla de virus type C. On peut remarquer que c'est également au Danemark que l'on a rencontré la plus grande variété des virus comme des Adenovirus.

c) - CONCLUSIONS :

De ces quelques données épidémiologiques et géographiques, il apparaît que, en ce qui concerne le vieux continent, la grippe a débuté aux confins asiatiques de la Russie (Mongolie). Il est regrettable que nous n'ayons aucun renseignement concernant les virus ayant causé l'épidémie de grippe en Mongolie car cela aurait permis de voir s'il y avait une corrélation entre la grippe mongole et celles qui se déclarèrent plus tard le long du Transsibérien et dans le centre et le Sud de la Russie.

De par la prépondérance du virus de type A_2 , et de par les données chronologiques on peut supposer que c'est à partir de la Russie d'Europe que déferlèrent les principales

vagues épidémiques vers les pays de l'Europe Centrale et occidentale ainsi que vers les contrées scandinaves. On peut remarquer que ces vagues allèrent décroissant à mesure qu'elles s'éloignaient de leurs points d'origine en U.R.S.S.

II - En FRANCE

a) - Données épidémiologiques et géographiques :

Rhône-Lyon : Des cas d'allure épidémique de grippe furent déclarés dans le département du Rhône à la fin du mois de Janvier jusqu'à la première moitié du mois de Février, en particulier à l'Hôpital "Debrousse", à l'Hôpital "Edouard Herriot" et à la pouponnière "La Fongeraie".

D'autre part, l'enquête sérologique continue émanant de la zone Rhône-Alpes Est fait état de sérums de malades atteints d'affections respiratoires aiguës.

A la fin du mois de Février, une épidémie se déclara dans une institution d'enfants inadaptés à Brignais dans la banlieue de Lyon. A Thizy, une Ecole Technique fut atteinte dans la première semaine du mois de Mars. Au début de ce même

EPIDEMIE 1965 AU SUD DE LA FRANCE

	Déc. 1964	Jan. 1965	Fév. 1965	Mars 1965	Avril 1965
GUERET			←————→		
NIORT			←.....→		
BRIVE			←————→		
AIN			←————→		
RHONE			←————→		
LOT ET GARONNE			←-----→		
HAUTES PYREN.			←-----→		
ARIEGE			←-----→		
CHARENTE			←-----→		
LANDES			←-----→		
Hte VIENNE			←-----→		
AVEYRON				←-----→	
TARN ET GARON.				←————→	←————→
DOUBS				←————→	
LOIRE				←————→	
BOUCHES DU R.		←.....→	←.....→	←.....→	

Type A₂ ←————→

Type B ←.....→

Sérologie non faite ←----→

mois quelques cas furent à nouveau observés dans deux hôpitaux à Lyon : "Ste Eugénie" et "Jules Courmont". Ces derniers cas furent dépistés par l'enquête sérologique continue.

Basses-Pyrénées : Une épidémie se déclara dans un lycée de garçons à Pau et, pendant les deux premières semaines de Mars une épidémie atteignit un hospice de vieillards à Albigny.

Après le 20 Mars, des cas de grippe continuèrent à être identifiés par les réactions sérologiques chez les malades des hôpitaux, mais il s'agissait de cas isolés.

Creuse : Egalement au début de Février une épidémie se déclara dans diverses collectivités de Guéret.

Lot et Garonne : 17 cas furent déclarés dans un hopital de Laparade.

Deux-Sèvres : Pendant la deuxième moitié du mois de Février une épidémie éclata dans un hospice de vieillards de Niort. Cette épidémie semble avoir été assez grave puisqu'elle provoqua dans cet hospice huit décès.

Hautes-Pyrénées : Vers le milieu du mois de Février des épidémies éclatèrent dans divers établissements de cette région (Bigorre, Bagnières de Bigorre, Tarbes, Lannemezan).

Haute-Garonne : Une épidémie de 500 cas se déclara à Ramon ville.

Corrèze : Vers la fin du mois de Février une épidémie se déclara dans la population. Commencée à la limite du département de la Creuse, elle s'étendit peu à peu à tout le département. Treize décès furent déclarés.

Ain : Egalement à la fin du mois de Février une épidémie se déclara dans un hopital de vieillards à Bourg. A Hauteville un sanatorium fut touché.

Charente : Des cas disséminés dans la population d'Angoulême se développèrent sans provoquer de véritable épidémie .

Ariège : Fin Février une épidémie importante se déclara dans un collège d'enseignement technique puisque 93 élèves sur 145 furent atteints.

Landes : Une épidémie se déclara dans un collège de Capbreton, ainsi que dans deux autres à Dax et Mont de Marsan.

Haute-Vienne : A la fin du mois de Février les journaux firent état d'une importante épidémie à Limoges qui obligea de fermer certains services où 70 % du personnel était atteint. Il est symptomatique de constater que ces informations nous parvinrent par voie de presse et non pas par voie officielle : ce qui aurait dû se produire pour une épidémie aussi large.

Aveyron : Une école technique d'Aubin fut atteinte pendant la première quinzaine de Mars.

Tarn et Garonne : A Montauban une épidémie se déclara dans un séminaire à la même époque. Divers établissements scolaires et différentes collectivités furent également atteints. Mais la grippe sévit également dans le département sous forme bénigne et sans complications graves.

En ce qui concerne les collectivités scolaires, il a été noté que le nombre atteints était très inférieur à celui noté pendant l'épidémie de 1959, où le nombre de malades oscillait entre 10 et 25 %.

Doubs : Des cas de grippe furent déclarés pendant le mois de Mars.

Loire : Un cas de grippe fut identifié dans un hospice de vieillards de St Etienne.

Bouches-du-Rhône : Une note en date du 15 Mars 1965 signée par le Directeur général de la Santé Publique indique que dans onze établissements scolaires situés dans diverses localités du département un absentéisme variant entre 10-30 % fut enregistré.

Meurthe et Moselle : Le Ministère de la Santé Publique signala pour la fin du mois de Mars une petite épidémie dans un collège technique de Lunéville, ainsi que dans deux établissements scolaires à Toul et à Laxou.

Haute-Saône : Un foyer épidémique fut déclaré à Dampière.

Mayenne : Depuis le début du mois de Mars de très nombreux cas de grippe furent observés à Laval parmi la population civile et dans les hôpitaux. Des cas furent également signalés à Château-Gauthier.

Loiret : Egalement en Mars on signale trois foyers de grippe concernant l'un, une maison de retraite, les deux autres des collectivités scolaires.

b - Types de virus en cause

Le bilan des souches de virus grippal isolées au cours d'épidémie observée dans le Sud de la France en 1965 et effectué par la Section de virologie du laboratoire national de la Santé Publique montre que quatre souches de type A₂ furent isolées et une souche de type B.

En ce qui concerne les souches A₂ elles furent respectivement isolées à Guéret dans la Creuse, à Brive dans la Corrèze, à Niort dans les Deux-Sèvres et à Cayssiols dans l'Aveyron. Quant à la souche de type B elle fût également isolée à Niort.

Du point de vue sérologique le type A₂ fut également mis en cause dans la plupart des départements. Dans les Bouches-du-Rhône il a été identifié en plus du type A₂ quelques cas de grippe B.

Il est regrettable de constater que pour la moitié des départements touchés plus ou moins par la grippe on n'ait aucun renseignement permettant de juger de l'importance de l'épidémie et que l'on n'ait reçu ni sérums ni prélèvements. Faut-il souligner le cas de la ville de Limoges où certaines

collectivités virent 70 % de leur effectif atteint sans qu'aucune donnée clinique et épidémiologique ne parvienne au laboratoire ? Ou bien le cas de Cayssiols, où 8 écouvillonnages de gorge furent mis dans un seul tube sans milieux, et tous les prélèvements de sang furent envoyés dans les flacons contenant le milieu de transport destiné à contenir les écouvillons. Cependant en dépit de ce manque de précaution, ces prélèvements nous ont permis d'isoler la souche dite "Cayssiols" qui s'est montrée des plus virulante.

c) - Conclusions :

Du tableau ci-joint on peut malheureusement se rendre compte de manière plus imagée combien de faits épidémiques restent sans étiquette quant aux virus responsables. Il semble que le décret ministériel 71 b du 11 Septembre 1957 réglant les modalités de prélèvement et d'envoi au laboratoire des produits permettant le diagnostic biologique de la grippe ait eu un faible retentissement parmi les organismes destinés à le faire respecter.

On peut faire remarquer que pour presque toutes les épidémies pré-citées les informations furent recueillies par la section de Virologie du Laboratoire National de la Santé Publique elle-même et que fort peu de renseignements émanaient des Services de la Santé Publique.

CHAPITRE II

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES VIRALES

A) Traitement préalable

- 1°) des prélèvements contenus dans le milieu de Taylor
- 2°) des prélèvements déjà sur cellules.

B) Cultures sur cellules

1°) Choix des cellules à employer

- Primocultures
- Reins de singe

2°) Isolement sur cellules

- Effet cytopathogène
- Hémadsorption
- Hémagglutination
- Passages

C) Cultures sur oeuf embryonné

Technique d'inoculation

- 1°) dans la cavité amniotique
- 2°) dans la cavité allantoïque

Récolte

D) Isolement sur cellules et sur oeuf

E) Identification

1°) Fixation du complément

2°) Inhibition d'hémagglutination

CHAPITRE 2

ISOLEMENT DES SOUCHES VIRALES

A - TRAITEMENT PRELIMINAIRE

1 - Des prélèvements contenus dans le milieu de Taylor.

Au moment de son arrivée au laboratoire le prélèvement devra subir un traitement précédant sa mise en culture. On met l'écouvillon et le milieu de Taylor dans un tube à centrifuger à fond rond (15 ml de volume, 90 mm de hauteur et 20 mm de diamètre) contenant quatre ou cinq perles de verre, dit "tube de perles". On y ajoute des antibiotiques pour empêcher toute contamination bactérienne.

pénicilline	0,1 ml (20 000 unités)
streptomycine	0,1 ml (0,02 g)
mycostatine	1 goutte

On agite sur agitateur de Kahn pendant trois minutes. On laisse reposer 30 minutes à 4°C. Le surnageant est mis dans 3 tubes contenant une culture cellulaire de rein de singe et 0,9 ml. de milieu de survie (Parker) à raison de 0,1 ml par tube.

S'il en reste on le met à congeler en tubes "maigres" à - 50°C.
Les tubes inoculés sont mis à l'étuve à 33°C.

2 - Des prélèvements déjà en contact avec les cellules

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, l'écouvillonnage ayant été fait, on immerge l'écouvillon dans le flacon et on l'agite dans le milieu. On retire alors l'écouvillon et on renverse le flacon de manière à ce que le milieu vienne en contact avec les cellules. On met alors ce flacon à l'étuve à 33°C pendant 5-6 heures pour que le virus infecte les cellules.

Pour prévenir une souillure bactérienne on ajoute des antibiotiques :

pénicilline	0,3 ml	(60 000 unités)
streptomycine	0,3 ml	(0,06 g)
mycostatine	0,05 ml	

On remet le flacon à l'étuve pendant une demi heure puis on change le milieu de survie. Cette opération est terminée, le flacon est remis à 33°C.

B - CULTURES SUR CELLULES

1 - Choix des cellules à employer

Pour la culture des virus grippaux c'est finalement toute la gamme des différents moyens de cultures que les chercheurs ont tenté d'utiliser avec plus ou moins de succès : soit en primoculture ou en lignée continue.

Primoculture : Des essais d'isolement des virus A et B furent effectués par W.J. Mogabgab et Coll. sur des cultures de poumon et de rein embryonnaire humain mais ils montrèrent par la suite que des résultats similaires pouvaient être obtenus en faisant ces isollements sur des cultures de rein de singe. Simpson et Coll. montrèrent que des virus A et B isolés et cultivés sur des tissus embryonnaires humains différaient des mêmes virus passés sur l'oeuf embryonné. Hinz et Coll préparèrent des primocultures de poumon humain, de lapin et de porc et les mirent respectivement en contact avec des souches A et B humaines et porcines. L'effet cytopathogène était plus important avec l'espèce animale correspondante, alors que les cellules de poumon de lapin ne furent pas attaquées par les virus humains et porcins. A la suite des travaux de Mogabgab et coll et de ceux de Takemoto et coll., Holper et Marquis tentèrent de préparer des

cultures cellulaires de rein de porc en remplacement des reins de singe d'un prix trop élevé et difficiles à obtenir. Bien qu'ils aient essayé différents milieux de croissance les résultats furent assez décevants puisque les cellules ne formaient pas de nappe continue.

Par contre, les cellules de rein de veau furent utilisées par F. Lehmann -Grube avec succès pour sept souches différentes de virus grippal. Le rendement quantitatif par cellules s'avéra aussi élevé que celui obtenu sur l'oeuf embryonné de poule, mais le taux de multiplication était inférieur à celui des oeufs.

Plusieurs souches de virus grippal (A et B) furent multipliées sur des cultures de poumon d'embryon de poulet, mais seul NWS - (neurotropic variant strain) endommagea les cellules. Des cultures primaires de foie d'embryon de poulet furent également essayées.

Les types A et B du virus grippal furent isolés sur des cultures de rein de singe par de nombreux chercheurs. Certains prétendaient avoir un meilleur isolement sur des cultures de tissu que sur des oeufs alors que d'autres affirmaient le contraire. Des différences dans l'isolement des types A et B effectué

à l'aide de ces deux méthodes furent également relevées. Mais Davenport et coll. après avoir fait des études comparatives trouvèrent que le taux d'isolement était le même sur oeuf que sur des cultures de tissu, si l'on avait utilisé un matériaux frais pour l'isolement et si les oeufs ou les cultures étaient incubés à 35-37°C.

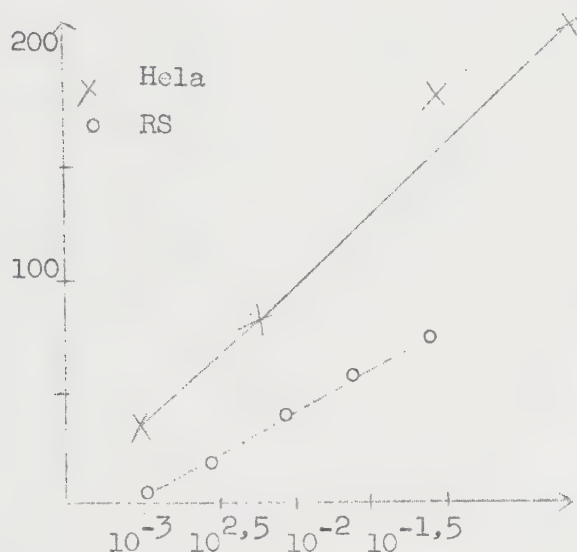
Rein de singe : Mogabgab et coll. et à sa suite Takemoto et coll. furent les premiers à utiliser ce moyen d'isolement. Une comparaison fut établie entre l'isolement, mené en parallèle des virus A, B et C sur culture de rein de singe et sur l'oeuf embryonné de 11 jours. Il apparut que le virus B était plus facilement isolable sur RS que sur l'oeuf embryonné. Les types A et C purent également être isolés sur RS mais avec plus de difficulté. L'ECP produit par 3 types A, B, C est sensiblement le même et s'accompagne d'une production d'hémagglutinine. Takemoto et coll. reconnaissent 3 avantages à la culture de RS sur l'oeuf embryonné :

- Les souches B connues peuvent être plus facilement isolées
- Le temps d'isolement et d'identification est diminué
- d'autres virus respiratoires comme le type 3 APC ont pu être isolés.

Une autre étude comparative fut menée entre les cellules Hela et RS pour le développement d'hémagglutinine du virus grippal

type A : La production d'hémagglutinine sur RS fut supérieure à celle obtenue sur Hela. (T 1)

Agglutinats d'hématies



Dilution du virus de la grippe A/
NS/45/57

CHANOCK et coll. ont fait des expériences pour voir l'influence du pH dans les cultures de RS inoculées avec la grippe A2. Ils ont vu que la croissance du virus sur les cellules est optimum quand le pH est de 6,2 et inhibée quand le pH est alcalin.

2 - Isolement sur cellules

Technique

Au laboratoire d'hygiène nous utilisons la technique suivante : On utilise des cellules de rein de singes (vervet, cynomolgus ou baboin). Avant l'inoculation on remplace le milieu de croissance par 0,9 ml de milieu de survie (1 ml dans les tubes témoins). On inocule avec 0,1 ml de prélèvement préalablement traité comme nous avons vu plus haut et on met les tubes à 33°C.

Le milieu, s'il est trop acide est changé après 6 ou 7 jours.

On lit tous les deux jours l'ECP et le 6ème ou le 7ème jour on effectue une hémasorption. Si elle est positive, on recherche aussi la présence d'hémagglutinine. Au 10ème et 14ème jour on refait une nouvelle hémasorption. Au 14ème jour on récolte les tubes en grattant, si les cellules ne sont pas tombées et on fait un passage.

Le phénomène d'hémasorption décrit par Shelokov et Vogel est le suivant : Des cellules infectées par un virus grippal fixent des hématies de cobaye ou du groupe O humain. Hotchkiss et coll. ont fait des études au microscope électronique concernant le mécanisme de l'hémasorption du virus grippal A sur cellules de RS. Chanock et coll ont confirmé l'importance de ce phénomène. En effet la présence du virus grippal ou d'autres myxovirus peut être détectée habituellement par hémasorption 1 ou 2 jours avant l'apparition de l'ECP. Certaines souches A₂ et B ont un ECP faible ou nul durant le premier passage sur culture de tissus et pourraient de ce fait être complètement ignorées sans l'aide de l'hémasorption. Son intérêt réside surtout dans le fait qu'elle permet de déceler rapidement la présence de certains virus dans les cellules infectées avant l'appa-

rition des signes visibles. L'hémasorption peut être utilisée soit pour déceler la présence d'un virus dans une culture cellulaire, soit pour l'identifier par l'inhibition de l'hémasorption.

On change le milieu de survie, et on ajoute une suspension de globules rouges de cobaye à 0,4 %. On laisse en contact pendant une demi-heure à la température de 4°C.

- ECP : On constate d'abord un état granuleux du cytoplasme, les cellules s'arrondissent et se groupent en amas.

- Hemagglutination : On peut mettre en évidence l'hémagglutinine quand l'ECP est déjà décelé. Dans les travaux de Nogabgab et Coll et Davis et coll, il est dit que l'on peut voir l'apparition d'hémagglutinine après un ou deux jours, mais aussi plus fréquemment à partir du 4ème ou 6ème jour d'après les observations de Nogabgab et de Takemoto.

Pour orienter l'identification du type viral on peut utiliser des hématies de différentes origines. On a remarqué que les virus de type A n'agglutinaient pas les hématies de poulet à 22°C, alors que les virus de type B le faisaient. Mais à 4° le type A agglutine les hématies humaines du type O avec un titre supérieur à celui obtenu avec les hématies de poulet, alors que

le type B agglutine les deux sortes d'hématies avec le même titre. Le type C, d'après Nogabgab agglutine également à 4°C les hématies humaines O et les hématies de poulet. Si l'hémagglutination est négative on fera un deuxième passage, soit sur cellules, soit sur oeuf. Si l'hémagglutinine n'apparaît pas après le deuxième ou le troisième passage il est inutile de continuer.

La grippe A apparaît souvent au premier passage, mais au deuxième passage le type A₂ perd souvent de sa virulence, ce qui se manifeste par une faible hémadsorption et une faible hémagglutination. La différence entre les souches A et B réside dans le fait que la souche A a une hémadsorption faible et une quantité d'hémagglutinine insuffisante pour effectuer une inhibition d'hémagglutination, alors que les souches B ont une hémadsorption complète avec suffisamment d'hémagglutinine pour faire une inhibition.

C - CULTURES SUR OEUF EMBRYONNE

F.M. Burnet fut le premier à avoir utilisé l'oeuf embryonné pour isoler le virus grippal. Simpson et coll. ont déterminé que la grippe type A donne un titre hémagglutinant plus élevé après passage sur l'oeuf que sur culture de tissus.

Comme hématies il a utilisé les hématies humaines, de poulet, de mouton et de singe. Le même effet a été remarqué avec le type B mais la culture cellulaire des grippe A et B montrent une affinité supérieure pour les GR de singe. Lennete utilise des oeufs de poule embryonnés à 10-12 jours. L'inoculation a été effectuée le plus souvent par la voie amniotique, étant donné que la membrane amniotique est susceptible d'être infectée par les souches de type A. La nouvelle souche ainsi isolée après un ou deux passages supplémentaires amniotiques peut être maintenue par passage allantoïque. Au contraire les souches de type C peuvent apparaître au laboratoire seulement par passage amniotique. Les souches du type B peuvent être obtenues par l'une ou l'autre voie.

Technique utilisée au laboratoire d'hygiène :

On utilise des oeufs embryonnés de poule incubés pendant 10 jours à 35°C. Chaque oeuf est inoculé avec 0,1 ml de prélèvement par la voie allantoïque et avec 0,1 ml par la voie amniotique. On les laisse dans l'incubateur à 35°C pendant 2-3 jours. On les mire tous les jours pour voir s'ils sont toujours en vie. On jette les oeufs morts le premier jour, mais on conserve ceux des jours suivants à 4°C. Avant la récolte tous les oeufs sont mis à 4°C. Les liquides allantoïque et amniotique sont prélevés séparément et sur chacun d'eux est effectuée une hémagglu-

tion pour voir la présence d'hémagglutinine.

Tous les liquides négatifs sont jetés ; sur les autres on procède à une nouvelle hémagglutination, les liquides étant titrés par dilution de 1/2 en 1/2. Les liquides fortement positifs sont utilisés en sérologie pour la réaction de fixation du complément comme antigène en présence des sérums de référence anti-A et anti-B pour affirmer que le virus isolé est bien du type A ou du type B. Les liquides sont congelés à - 20°C ou mieux à - 50°C.

En cas d'absence d'hémagglutinine les liquides allantoïques et amniotiques sont réinoculés sur l'oeuf dans la double cavité allantoïque et amniotique comme précédemment.

Technique d'inoculation

Il y a deux techniques différentes suivant que l'on passe par la voie amniotique ou par la voie allantoïque.

1°) - Inoculation dans la cavité amniotique

Il y a beaucoup de différentes variantes en particulier celle de Burnet, de Taylor et col. Hirst, Enders et Levens et de Sobier et Esser, cette méthode étant utilisée au labora-

toire d'hygiène. Les avantages de cette méthode sont nombreux : en plus de la sécurité et de la simplicité qu'elle offre, le pourcentage d'erreur est ramené à 10 % et elle permet toujours et surtout de pratiquer des inoculations en série et d'effectuer alternativement des inoculations amniotiques et allantoïques.

2°) Inoculation dans la cavité allantoïque

Il y a deux méthodes : la technique d'injection à travers la poche et la technique d'injection directe que nous utilisons :

On repère au crayon (sous mireur) un point situé sur le grand diamètre de l'oeuf à 2 ou 3 cm de la base de la chambre à air de manière à ce qu'il n'y ait pas à cet endroit de vaisseaux visibles. On pratique une perforation punctiforme de la coquille sans toucher à la membrane coquillière. On applique alors une goutte d'alcool iodé au 1/10 et on injecte au moyen d'une aiguille à biseau court de 5/15 que l'on enfonce de 3-4 mm.

Récolte :

Après incubation à 35°C 2-3 jours les oeufs ayant été conservés à 4°C, au moins pendant une nuit pour éviter toute hémorragie à la récolte. On désinfecte les points d'inoculation

avec de l'alcool iodé au 1/10ème. On découpe la coquille avec des ciseaux et on déchire la membrane coquillière avec des pinces. On prélève le liquide allantoïque avec une pipette à boule puis avec une autre pipette le liquide amniotique après avoir déchiré la membrane correspondante.

Ces deux liquides sont mis dans des tubes stériles et conservés à - 20°C. Après titrage de l'hémagglutinine on effectue un contrôle de stérilité sur bouillon ordinaire.

D - Isolément sur cellules et sur oeuf

Souvent les virus A et B se perdent au deuxième passage sur les cellules, alors que l'on obtient toujours une culture positive sur oeuf, c'est pourquoi on renforce la virulence de ces souches par passage sur l'oeuf.

Isolément des souches en 1965 :

Pendant l'épidémie de grippe 1965 en France, au Centre National de la grippe à Lyon furent isolés 5 souches de type A₂ et une souche de type B.

Nom de la souche	Requ le	inoculation sur TC							Inoculation sur oeuf			Identifica.
		Date	origine d'inocul.	TC orig.	1 ECP	HAD	HA	Date	origine de l'inoculum	Date	HA	
SOULARD 00857 p ₁ p ₂	18.II	18.II	pp	RSB	22.II +	24.II +++	26.II +	1.III	Liquide p ₁ cellulaire du 26.II.65	4.III	10	Type B
		12.IV	Surnag. et cell.	RSB	15.IV +	22.IV +++	20.IV++					
BLONDONNET 00828 p ₁ p ₂	10.II	10.II	pp	RSB	15.II +	15.II++++	20.II +	15.II p ₁	pp	18.II	Ø	Type A ₂
		16.II	Surnag. cellul. du 16.II	RSB	22.II +	22.II +	24.II Ø	22.II p ₂	Liquide amniotique	25.II	20	
BRIVE 00871 p ₁	1.III	1.III	pp	RSB	9.III ±	9.III ++	9.III +	1.III	pp	4.III	+	Type A ₂
		29.IV	Surnag. cellul.	RSV	Ø	13.V. ±	nf	8.III	Liquide amniotique	11.III	40	
POUSSARD 00856 p ₁ p ₂	18.II	18.II	pp	RSB	Ø	4.III +++	4.III Ø	20.IV	Liquide cellulaire du 15.III	23.IV	+ 32	Type A ₂
		9.III	Surnag. et cell.	RSV	15.III++	15.III+++	15.IIIØ					
CAYSSIOLS 00914 p ₁ p ₂	15.III	15.III	pp	RSB	24.III++	25.III+++	29.III+	5.IV	Liquide cellulaire du 25.III	8.IV	32	Type A ₂
		24.III	Liquide cellules	RSV	29.III++	31.III ++	Ø					
AUBERT 00829 p ₁ p ₂	10.II	10.II	pp	RSB	16.II +	17.II++++	17.II++	20.IVp ₁	Liquide cellulaire du 17.II	23.IV	0	Type A ₂
		16.II	Surnag. et cell.	RSB	Ø	22.II ++	22.II +	26.IVp ₂	Mélange amniotique	29.IV	+ 8	

pp = Prél. pharyngé

RSB = rein de singe baboin

RSV : rein de singe vervet

TC = effet cellulaire

ECP = effet cytopathogène

p = passage

HA - hémadsorption

SCHEMA D'ISOLEMENT

pp = prélèvements pharyngés

RSB = rein de **s**inge **b**aboin

RSV = rein de **s**inge **v**ervet

H = hémagglutination

HA = hémadsorption

p = passage

Souche	TC	Culture sur oeuf	Type
SOULARD	HA = +++ H = + 1 p pp ——— RSB ——— H = + 2 p RSB H = ++ HA = +++	H = + 0	B
BLONDONNET	H = + HA = +++ 1 p pp ——— RSB RSB H = 0 HA = +	pp ——— 0 1 p H = 0 2 p H = + 0	A ₂
BRIVE	H = + HA = ++ 1 p pp ——— RSB 2 p RSV H = 0 HA = ±	pp ——— 0 p₁ H = + p₂ H = ++ 0	A ₂
POUSSARD	H = 0 1 p pp ——— RSB 2 p RSV H = 0 HA = +++	1 p ——— 0 H = +	A ₂
AYSSIOLS	HA +++ H ± 1 p pp ——— RSB 2 p RSV HA = ++ H = 0	1 p ——— 0 H = ±	A ₂
UBERT	HA +++ H ++ 1 p pp ——— RSB RSB H = ± HA = ++	1 p ——— 0 H = 0 0 H = +	A ₂

Tous les prélèvements reçus furent traités par les méthodes précédemment décrites. Nous avons inoculé les prélèvements d'abord sur les cultures cellulaires de reins de singe baboin qui font preuve d'une forte sensibilité au virus grippal. La souche B, comme nous pouvons le voir sur le tableau d'isolement fut isolée sur cellules. Elle a provoqué un ECP normal, une hémadSORption forte et une solide hémagglutination à chacun des deux passages.

Quant aux souches A₂ isolées sur cellules, leur comportement diffère : au premier passage elles hémagglutinent, alors qu'au deuxième et à tous les passages suivants elles perdent leur pouvoir d'hémagglutination. Nous avons fait la même constatation avec les cellules RS de baboin après les avoir changées pour des cellules de reins de singe vervet. Les souches "Poussard" et "Cayssiols" en sont l'illustration : le virus inoculé sur cellules RSB a donné après 14 jours une forte hémadSORption, mais sans hémagglutination. Après passage sur oeuf nous avons eu un résultat satisfaisant.

Nous avons utilisé l'inoculation sur oeuf pour faire le deuxième passage après les cellules. Les oeufs ont été inoculés toujours par double voie. Pour l'inoculation du deuxième passage nous avons utilisé le liquide amniotique.

Les souches de type A₂ proviennent des villes suivantes :

GUERET (Creuse) : 7 échantillons sont arrivés au Laboratoire National. Ils ont été congelés et envoyés dans la neige carbonique. Parmi ces 7 prélèvements nous avons pu isoler :

Blondonnet : Cette souche fut isolée sur
(A₂ Lyon cellules de RSB mais fut perdue
1/65) au deuxième passage. L'isolement sur oeuf nous donna une hemagglutination positive après deuxième passage.

Aubert : Le prélèvement fut inoculé sur RSB, après 7 jours nous avons remarqué une hémagglutination (+ +), perdue au deuxième passage sur RSB. Mais le liquide cellulaire après le premier passage fut inoculé sur oeuf, ce qui nous a donné après deux passages un résultat satisfaisant. Cette souche ne fut pas enregistrée à l'OMS.

BRIVE (Corrèze) : 6 échantillons provenant de Brive congelés
A₂/Lyon/3.65 et transportés dans la neige carbonique furent
reçus. Après le premier passage sur RSB nous avons
perdu le virus pendant le passage suivant sur
RS Vervet. Ce virus fut isolé au deuxième
passage sur oeuf embryonné.

NIORT (Deux-Sèvres) : Cette souche fut isolée à partir de 4
Poissard échantillons congelés et envoyés dans la neige
A₂/Lyon/5.65 carbonique. Les inoculations sur RSB et un
deuxième passage sur RSV ne nous donnèrent pas
de résultat. Le liquide cellulaire après le
premier passage fut inoculé sur oeuf, ce qui
nous permit de l'isoler.

CAYSSIOLS (Aveyron) : Aucune précaution ne fut prise dans ce cas,
Cayssiols parce que nous avons reçu dans un seul tube
A₂/Lyon/4.65 sec, sans milieu, sans être congelé, 8 écou-
villons. Après traitement préalable les RSB
furent inoculés. Il y eut une hémadsorption
forte, sans hémagglutination, plus faible au
deuxième passage sur RSV.

Nous avons inoculé le liquide cellulaire
après le premier passage sur l'oeuf embryonné,

qui nous a donné un résultat satisfaisant.

La souche B fut isolée à partir des 4 prélèvements de Niort (Deux-Sèvres). Nous l'avons isolée sans difficulté sur cellules en deux passages avec une très forte hémagglutination. Le passage sur oeuf fut effectué parallèlement.

Parmi les 46 prélèvements provenant d'endroits différents 4 souches A_2 et une souche de type B furent isolées. Mais il y eut beaucoup de pertes. La réaction de fixation du complément fut effectuée avec tous les sérums qui accompagnaient les écouvillonnages. 16 sérums furent positifs, alors que les écouvillonnages correspondants ne permirent pas d'isoler le virus.

Le passage sur cellules se prêtent davantage à une grande production de virus, que les passages sur oeuf. Il serait intéressant de rechercher la raison pour laquelle le virus de type A_2 se perd à partir du deuxième passage sur cellules. Ce point est très important pour la culture du virus de la grippe en ce qui concerne le diagnostic de laboratoire mais il devient capital pour une fabrication de vaccin car il permettrait d'économiser temps et argent.

E) - IDENTIFICATION

L'identification fut effectuée immédiatement après l'isolement. Nous avons utilisé deux réactions pour l'identification : Fixation du complément et l'inhibition d'hémagglutination.

Fixation du complément : La méthode utilise deux antigènes qui peuvent fixer le complément en présence du sérum de référence ou d'un sérum humain.

L'antigène "soluble" (S) est spécifique du type et il est commun pour toutes les souches d'un type A, B ou C. Il se trouve dans les tissus infectés.

L'antigène "viral" (V) est spécifique de la souche. Il caractérise les sous groupes (A, A₁ ou A₂) ou même les variantes antigéniques.

Du point de vue de l'identification, la réaction d'inhibition avait la primeur pour déterminer les groupes et spécialement les sous groupes. Les travaux de Hoyle et coll, et de Lief, Fabiyi et Henle ont donné à la fixation du complément une place encore plus importante. Henle et Coll pensent que l'inhi-

bition d'hémagglutination ne donne pas de résultats sûrs parce qu'il existe souvent beaucoup de facteurs qui empêchent d'avoir un résultat correct : la variation des phases, les inhibiteurs non spécifiques, etc...

Pour la préparation de l'antigène "viral" pur il existe des méthodes différentes basées sur le même principe. La méthode de l'O M S utilise le R D E pendant l'élution , alors que nous avons utilisé une modification de la méthode mise au point par Henle et transmise par le Dr. Paccaud*.

On récolte le liquide allantoïque sanglant des oeufs embryonnés inoculés 40 heures auparavant par le virus grippal, les oeufs étant encore chauds et on l'incube environ 30 minutes sur de la glace pilée. Après centrifugation à basse vitesse et décantation, on ajoute au surnageant 5 % d'hématies de poule. On laisse incuber 45 minutes sur de la glace. On fait trois adsorptions. On réunit les bouillottes des trois adsorptions, on les lave trois fois avec du PBS NaOH (pH 8) glacé. On centrifuge

* Nous remercions le Dr. Paccaud, directeur du laboratoire de Virologie - Institut d'Hygiène Genève - pour son aide.

et on décante. On ajoute aux culots du PBS (pH 7,2 - 7,5) en un volume tel que l'on obtienne une solution 10 à 20 fois plus concentrée par rapport au volume précédent.

On élue à 37° pendant 3 heures en agitant doucement (risque d'hémolyse), on centrifuge et on décante puis on conserve à +4°C.

Contrôle : On utilise la réaction d'hémagglutination. On contrôle le surnageant après adsorption, les trois lavages et l'antigène final. On prend 0,2 ml de virus et 0,2 ml d'hématies de poule (0,75 % en suspension).

La préparation d'antigène particulière exige un second cycle d'adsorption pour que l'antigène ne contienne plus de partie "soluble externe". La procédure est la même seulement l'antigène est dilué 3 fois en PBS NaOH (pH8).

Pour la conservation on ajoute des antibiotiques. (Pénicilline et streptomycine) et on met à 4°C.

Pour obtenir un sérum de référence (antisérum spécifique de la souche) il faut préparer l'antigène "viral pur" sans soluble externe et interne. Pour la préparation de cet antigène

on part d'un antigène après avoir procédé à un premier cycle, ayant un titre assez élevé. La suspension est mélangée avec un demi volume d'éther pour anesthésie pendant 2 heures sur agitateur magnétique. On laisse barboter avec de l'azote pendant une heure pour supprimer l'éther.

Après décantation, la phase aqueuse est mise en contact avec les hématies de cobaye (suspension finale 2 %) en travaillant sur glace. On rassemble les culots des 3 adsorptions. On lave trois fois en PBS (pH8) et on élue en PBS (pH 7,2 - 7,5) pendant 3 heures.

Contrôle: On répète le cycle 24 heures après comme précédemment décrit mais en utilisant des hématies de cobaye (1 % en suspension).

Inoculation : On inocule un cobaye 3 fois avec 1 ml d'inoculat par voie intra-péritonéale. Les deuxième et troisième inoculation ont lieu au 5ème et au 10ème jour après la première. Au 26ème jour l'animal est sacrifié. Le sérum est congelé à - 20°C.

Pendant notre travail nous avons préparé le sérum de référence de l'antigène "viral pur" de la souche A₂/Lyon/4/65 dite Cayssiols. La réaction fut faite avec les antigènes suivants:

VP 101	VP 108	VP 102	VP	Ag soluble
A PR8	Al/Lyon/32/57	A2/Singapour	A2/Jap/2/	
	dite Roybin	/4/57	505/57	A2/Singapour
			:préparé par:	/4/57
			le	
			:Dr Paccaud :	
baye 21 anti				
/Lyon/4.65	0	0	32	32
				0

Nous avons pu en conclure que la souche Cayssiols est bien du type A_2 ; elle est négative avec les antigènes de type A (PR 8) de type A1 (Roybin) mais elle est positive avec l'antigène viral pur du type A_2 (Singapour et JAP) . IL est logique qu'elle soit aussi négative avec l'antigène soluble Singapour.

Antigène soluble : Nous avons mis en contact les 45 sérums humains qui accompagnaient les prélèvements avec les antigènes "solubles" A_2 /Singapour/4/57 et B/Johannesb./33/58 qui ont été produits par le Centre National de la grippe à Lyon. La méthode de production (Lépine 1958) se divise en deux parties :

1 - Préparation de l'inoculat : Les oeufs embryonnés

de 9 jours sont inoculés avec 0,4 ml d'une dilution à 10^{-4} de liquide allantoïque infecté par le virus. Après une nouvelle incubation de 40-44 heures à 35° , les liquides allantoïques sont prélevés sur les oeufs préalablement refroidis sur de la glace. Le liquide doit avoir un titre suffisamment augmenté 640. S'il n'est pas utilisé immédiatement il est congelé à $- 70^{\circ}\text{C}$.

2 - Préparation de l'antigène : Nous inoculons l'inoculat, que nous avons préparé, sur des oeufs incubés pendant 11 jours. Après 6 heures d'incubation à 35°C on recueille les membranes chorio-allantoïques. Elles sont lavées dans trois récipients successifs contenant de l'eau physiologique puis séchées au papier buvard et pesées. Elles sont broyées au broyeur mécanique après avoir été additionnées de l'équivalent de leur poids d'eau physiologique. On obtient une dilution au 1/2. On centrifuge à 3 000 tours pendant 10 minutes, on recueille le surnageant et on l'expose dans une boîte de Petri au rayonnement d'une lampe "germicide" pour détruire le pouvoir infectieux. L'antigène est conservé à $- 20^{\circ}\text{C}$.

Nous avons fait la réaction de fixation du complément avec ces deux antigènes "solubles" et avec les 45 prélèvements de sérums sauf le "Cayssiols". La réaction de fixation du complément ayant permis une certaine orientation les virus isolés

furent identifiés par la réaction d'inhibition d'hémagglutination en présence des sérums de référence.

2°) - Inhibition d'hémagglutination : On peut utiliser un grand choix d'animaux : furet, cobaye, poule, etc... pour préparer les différents sérums de référence utilisés dans cette réaction.

Le Centre National de la grippe prépare lui-même les sérums de référence des différentes souches proposées par l'OMS.

Un jeune furet blanc est inoculé par voie intranasale après anesthésie à l'éther. Pendant l'anesthésie une prise de sang est effectuée pour vérifier l'absence d'anticorps anti-grippaux. Après l'inoculation la température augmente et elle est contrôlée chaque jour. Après 14 jours une autre prise de sang est faite pour voir le titre d'anticorps anti-grippaux. Le sang pris par ponction cardiaque sous narcose est centrifugé et le sérum est lyophilisé ou congelé à - 20°C. (Voir tableau des sérums de référence).

Les sérums de furet ont été volontairement préparés en ne procédant qu'à une seule inoculation de virus vivant par voie nasale, dans le but de tenter d'obtenir une infection expérimentale rappelant la maladie spontanée par le mode de

SÉRUMS DE RÉFÉRENCE PRÉPARÉS SUR FURETS
AU CENTRE NATIONAL DE LA GRIPPE A LYON

Furet n°	Souche inoculée Nom	Inoculée		Fièvre		A N T I C O R P S			
		Titre	Inoculé par voie intranasale	Max.	durée en jours	Avant	Titre	Après	Titre
1994	A ₂ /Singapour/4/57	≥ 1024	23.7.65	n.f.	n.f.	23.7.65	10	9.8.65	640
1791	A ₂ /Léningrad/65	64	14.5.65	39,2	10e - 11e	14.5.65	0	31.5.65	≥ 3072
7	Blondonnet	80	23.3.65	40,6 40,0	2e et 4-7e	23.3.65	0	7.4.65	1280
2024	Cayssiols	128	30.9.65	39,4	5-6e	30.9.65	20	20.10.65	1280
100	Ruguet	1280	23.2.66	41,2	1-5e	n.f.	n.f.	10.3.66	≥ 5120
103	Prezelj	128	22.4.66	40	3-7e	22.4.66	10	5.5.66	320

pénétration du virus et aussi d'éviter par des injections répétées d'antigène, l'apparition d'anticorps hétérologues. On constatera d'ailleurs, qu'on ne les évite pas complètement puisque tous les sérums obtenus par cette méthode, contenaient des anticorps non seulement homologues mais hétérologues.

Les souches isolées furent également envoyées au Centre Mondial de la grippe à Londres pour une identification et une comparaison avec d'autres souches. Sur le tableau I nous pouvons voir l'identification et la comparaison des souches Blondonnet (A2/Lyon/1/65) et Brive 871 (A2/Lyon/3/65) faites à Londres. Les deux souches Blondonnet et Cayssiols ont été inhibées par une gamme de sérums de référence de différents types A ; A1 ; A2 et avec les différentes souches de type A2 (des années 1957, 1962, 1963, 1964).

Le tableau II nous montre que les deux souches sont des souches A2. Du point de vue chronologique il fut remarqué une certaine ressemblance entre la souche de 1963 (A2/France/51/63) dite Ruguet) et les souches de 1965.

Le tableau III nous montre des résultats obtenus par l'inhibition d'hémagglutination de 8 virus de 4 pays différents (France, U.R.S.S., U.S.A. et Yougoslavie) et de différentes

TABLEAU I : INHIBITION D'HEMAGGLUTINATION AVEC DES SERUMS DE FURETS
PREPARES AU CENTRE MONDIAL DE LA GRIPPE A LONDRES

Souches	A2/Singapour/1/57	A2/Netherlands/65/63	A2/England/12/64	A2/Lénigrad/29/65
A2/Singapour/1/57	1280	120	60	240
A2/Netherlands/65/63	960	480	120	640
A2/England/12/64	240	240	480	1920
A2/Lénigrad/29/65	320	320	320	3840
A2/Lyon/1/65 (Blondonnet)	480	480	480	5120
A2/Lyon/3/65 (Brive 871)	240	160	320	2560

TABEAU II : SERUMS DE REFERENCE DE FURETS PREPARES AVEC DIFFERENTES Souches
GRIPPALES A₂ AU CENTRE NATIONAL DE LA GRIPPE A LYON

SERUMS	VIRUS	A1/LYON/132/ 57 (A1 Roybin)	A2/SINGAPOUR 4/57	A2/LYON/810/62 (A2 Napierala)	A2/FRANCE/ 51/63 (A2 Ruguette)	A2/LYON/1/65 (A2 Blondon- net)	A2/LYON/4/ 65 (A2 Cayssiols)	A2/LÉNIN- GRAD/29/ 65
Furet A2 Blondonnet F 7 7.4.65		40	320	160	1280	<u>640/1280</u>	1280	320
Furet A2 Léninegrad 1648 31.5.65		< 6	80 96	384	> 3072	1536	1280 3072	<u>640</u> <u>1536</u> *
Furet A2 Léninegrad 1791 31.5.65		< 6	192	768	> 3072	1536	> 3072	<u>2560</u> <u>> 3072</u> *
Furet A2 Singapour 1986 9.8.65		< 6	<u>1280</u> <u>768</u> *	1536	192	96	768	48
Furet A2 Singapour 1994 9.8.65		6	<u>1280</u> <u>3072</u> *	1536	384	96	320 768	40 96*
Philips Duphar A2 Singapour		24	<u>10240</u>	5120	1536	768	2560	768

années 1957, 1962, 1963, 1964, 1965. Les sérums de référence ont été produits par : Philips Duphar (anti A/Asia/57), WHO CDC Atlanta USA (sérum anti A2/Taiwan/1/64) et le Centre National de la grippe à Lyon.

Dans le tableau III, les virus sont rangés chronologiquement d'après leur année d'isolement en commençant par le virus A2/Singapour/4/57 isolé en 1957. Comme sérums de référence nous avons exclusivement des sérums de furets préparés par nos soins.

Du tableau IV il ressort essentiellement :

- que toutes les souches isolées à partir de 1963 sont nettement différentes des souches isolées en 1957 et en 1962 (A2/Singapour/57 et Napierala/A2/Lyon/62) ;

- le titre d'inhibition de l'hémagglutination est 4 fois plus élevé avec les antigènes préparés contre des souches apparues entre 63 et 1965, qu'avec le sérum préparé contre la souche A2/Singapour/57.

L'attention doit être attirée cependant sur certains points :

TABLEAU III : SERUMS DE REFERENCE DE FURETS PREPARES AVEC DIFFERENTES SOUCHES
GRIPPALES A₂ AU CENTRE NATIONAL DE LA GRIPPE A LYON

Sérum	Virus	A ₂ Taiwan/1/64 CDC ATLANTA USA	A ₂ Prezelj/64 ZAGREB Yougoslavie	A ₂ Singapour/ 4/57	A ₂ Leningrad/ 29/65	A ₂ France/51/ 63 Ruguet	A ₂ Lyon/1/ 65 Blondonnet	A ₂ Lyon/4/ 65 Cayssiols	A ₂ Lyon/810/ 62 Napierala
Philips Duphar A ₂ Singapour A/ASIA/57		320	160	10240	768	1536	768	2560	5120
Furet 1994 Singapour 4/57 9.8.65 Lyon		80	80	<u>640</u>	96	384	96	320	1536
Furet 1791 Leningrad 29/65 31.5.65 Lyon		1280	2560	192	<u>> 3072</u>	<u>> 3072</u>	1536	<u>> 3072</u>	786
Furet 7 Lyon 1/65 Blondonnet 7.4.65 Lyon		640	320	320	320	2560	<u>1280</u>	1280	160
Ser de poule A ₂ /Taiwan/1/64 WHO CDC 10.8.65 USA		<u>1280</u>	160	80	160	320	160	160	160
Furet 2042 Cays- siols Lyon/4/65 20.10.65 Lyon		640	640	80	640	1230	640	<u>1280</u>	80
Furet 103 A ₂ /PREZELJ/64 ZAGREB-Yougoslavie 5.5.66 Lyon		80	320	20	80	320	80	160	<102
Furet 100 Ruguet France/51/63 Lyon 10.3.66		1280	2560	320	1280	<u>> 5120</u> 2560	1280	1280	<102

TABLEAU IV : INHIBITION D'HEMAGGLUTINATION AVEC DES SERUMS DE FURETS PREPARES AU
CENTRE NATIONAL DE LA GRIPPE A LYON AVEC QUELQUES SOUCHES GRIPPALES
A₂ ISOLEES EN 1957 - 1962 - 1963 - 1964 et 1965

Sérums	Virus	1957	1962	1963	1964	1964	1965	1965	1965
		A2/Singapour/4/57	A2/Lyon/810/62 Napierala	A2/France/51/63 Ruguet	A2/Taiwan/1/64 CDC * Atlanta U.S.A.	A2/Prezelj/64 Zagreb Yougoslavie	A2/Lyon/1/65 Blondonnet	A2/Lyon/4/65 Cayssiols	A2/Leningrad/29/65
Furet 1994 A2/Singapour/4/57 Lyon 9.8.65		<u>640</u>	1536	384	80	80	96	320	96
Furet 100 A2/France/51/63 Lyon 10.3.66		320	20	>5120	1280	2560	1280	1280	1280
Furet 103 A2/Prezelj/64 Zagreb - Yougoslavie Lyon 5.5.66		20	10	320	80	<u>320</u>	80	160	80
Furet 1791 A2/Leningrad/29/65 Lyon 31.5.65		192	786	>3072	1280	2560	1536	>3072	>3072
Furet 7 A2/Lyon/1/65 Blondonnet Lyon 7.4.65		320	160	2560	640	320	<u>1280</u>	1280	320
Furet 2042 A2/Lyon/4/65 Cayssiols Lyon 20.10.65		80	80	1280	640	540	640	<u>1280</u>	640

* CDC : Communicable Disease Center.

- Le sérum de furet anti A2/Lyon/1/65 "Blondonnet" inhibe faiblement les souches "Prezelj" (Yougoslavie) et "Leningrad" (U.R.S.S.) et cette inhibition se fait au même titre que la souche A2/Singapour/57.

- Le sérum anti A2/Prezelj/64 inhibe faiblement les souches "Taiwan", "Blondonnet", et "Leningrad".

- Bien que la souche "Prezelj" soit nettement différente de la souche A2/Singapour/57 et de la souche "Napierala", elle paraît se distinguer cependant des souches "Taiwan", "Blondonnet" et "Leningrad".

Les constatations faites avec la souche et le sérum "Ruguet" permettent d'admettre que les variants que l'on a isolés en 1965 étaient très près de la souche "Ruguet" isolée en 1963. Tout paraît se passer comme si la variation antigénique s'était produite dès 1963.

Quant à la souche A2/Lyon/5/66 (Poussard), elle fut identifiée au Centre National de la grippe à Lyon. L'isolement fut mis en contact avec différents antisérums provenant de furet et de poule.

SERUM	:	:	:	:	:	:
	B antisérum	A1 anti-	A2	A2 anti	A2 anti	
	Soulard	Roybin	Napierala	Singapour	Blondonnet	
	B/Lyon/2/65	poule	poule	poule	furet 7	
VIRUS	:furet 1664	: A2/Lyon/	: A2/Lyon	: A2/Sing/	: A2/Lyon/	
		32/57	810/62	4/57	1/65	
	:	:	:	:	:	
Poussard	:	:	:	:	:	
A2/Lyon/	:	:	:	:	:	
5/66	10	80	5120	5120	2560	
	:	:	:	:	:	
	:	:	:	:	:	

La souche Aubert fut également envoyée au Centre mondial à Londres pour identification mais nous n'avons pas encore reçu de réponse.

La souche B/Lyon/2/65 dite "Soulard" fut également envoyée au Centre Mondial de la grippe à Londres. Là elle fut mise en contact avec les antisérums des différentes souches de type B. Les résultats sont intéressants parce qu'ils nous montrent un titre très élevé avec l'antisérum B/Singapour/64 et avec son sérum homologue (tableau V).

Nous avons effectué la réaction d'inhibition d'hémagglutination avec toute la variété chronologique des souches de type B et leurs antisérums :

TABLEAU V - INHIBITION D'HEMAGGLUTINATION AVEC DES SERUMS DE FURETS PRIRES
AU CENTRE MONDIAL DE LA GRIPPE A LONDRES

Souches	B/England/9/54	B/Johannesberg/ 33/58	B/Amakusa/1/64	B/Singapour/ 3/64	B/Taiwan/2/62
B/England/9/54	120	60	160	60	10
B/Johannesberg/33/58	40	1280	480	480	30
B/Amakusa/1/64	60	120	3840	120	60
B/Singapour/3/64	10	120	120	1920	60
B/Taiwan/2/62	10	60	10	30	480
B/Lyon/2/65 (Souillard)	30	160	120	960	80

TABLEAU VI : HEMAGGLUTINATION DU VIRUS B/SINGAPOUR/3/64 ET DE L'ANTISERUM B/SINGAPOUR/3/64 AVEC LES VIRUS ET ANTISERUMS GRIPPE TYPE B DU CENTRE NATIONAL DE LA GRIPPE A LYON

Sérum	Virus	B Taiwan 4/62	Corre B/Lyon/114/56	Johanesb. B/33/58	Soulard B/Lyon/2/65	Singapour B/Sing./3/64	Lee 5394
B anti poule Singapour/3/64 Who Atlanta U.S.A	Lot 1	24	<12	768	348	768	<12
Johanesbourg Furet 1 22.12.64		<12	<12	1536	48	96	<12
B Taiwan Furet 4 22.12.64		1536	<12	12	<12	<12	<12
B Soulard Furet 1646 17.5.65		192	<12	768	1536	1536	48
B Lee poule 24.I.62		48	48	96	24	24	1536

B/Lee/5394 et son antisérum de poulet

B/Lyon/114/56 dite "Corre" qui ressemble à la souche Bonn

B/Johannesbourg/53/58 et son antisérum de furet 1

B/Taiwan 4/62 et antisérum de furet 4

B/Singapour/4/64 et son antisérum de poulet WHO CDC Atlanta USA

B/Lyon/2/65 dite Soulard et antisérum de furet 1646.

D'après les résultats (tableau VI) nous pouvons constater une forte relation entre les souches postérieures à 1958 sauf B/Taiwan/4/62 qui fut inhibée très faiblement par les sérums de Singapour et de Soulard, et qui donna un résultat négatif avec Johannesbourg.

La souche Soulard (B/Lyon/2/65) est inhibée un peu par le sérum anti B/Lee/5394, mais son antisérum inhibe presque avec le même titre la souche B/Lee. Il est négatif avec la souche B/Lyon/114/56 dite "Corre".

CHAPITRE III

SEROLOGIE

I - Fixation du complément

- Réaction
- Résultats

II - Inhibition d'hémagglutination

1°) Hémagglutination virale

2°) Inhibition d'hémagglutination

- Inhibiteurs d'hémagglutination
- Réaction d'inhibition d'hémagglutination
- Résultats

I - FIXATION DU COMPLÉMENT

HOYLE, LIEF, HENLE, FABIYI et ses collaborateurs ont été les premiers à appliquer avec succès la réaction de fixation du complément pour la détermination des caractères antigéniques d'un virus et pour l'établissement du diagnostic et des enquêtes épidémiologiques.

Au Centre National de la grippe nous utilisons la méthode modifiée par SOHIER et COLL en 1956. C'est une micro-méthode très pratique pour effectuer non seulement le diagnostic mais également les enquêtes sérologiques par ce que l'on peut utiliser un grand nombre de sérums et d'antigènes divers.

Réactifs :

- Sérum: hémolytique concentré de l'Institut Pasteur
- Complément : sérum de plusieurs cobayes mâles conservé à - 25°C
- Solution tampon veronal (T.V.) de Mayer-Kraft avec du Ca et du Mg
- Formule : solution "mère"

NaCl		85 g
Veronal		5,57 g
Veronal sodique		3,75 g

Dissoudre l'acide dans 500 ml d'eau bidistillée. Compléter à 2 000 ml. Ajouter 1,86 g de HgCl_2 et 0,28 de CaCl_2 . Autoclaver 20 minutes à 105°C . Conserver à 4°C . pH 7,5.

Au moment de l'emploi, diluer au 1/5 dans l'eau bidistillée.

- Hématies : Suspension d'hématies préparées à l'Institut de mouton Pasteur.
- Sérums à expertiser inactivés à 56°C pendant 30 minutes. S'ils ne sont pas utilisés immédiatement ils doivent être conservés à -20°C .
- Antigène : La dilution à utiliser est celle qui permet de retrouver le titre du sérum de référence.

MATERIEL :

Tubes dit "à hémolyse" 13 x 65 mm

Tubes spéciaux 9 x 65 mm

Portoirs, pipettes, compte-gouttes spéciaux
donnant 45 à 50 gouttes par ml.

TITRAGE DU COMPLÉMENT :

Pour réduire les quantités d'antigènes utilisés on met en contact :

- Les dilutions du complément dans du TV

$\frac{1}{25}$; $\frac{1}{30}$; $\frac{1}{35}$; $\frac{1}{40}$; $\frac{1}{45}$; $\frac{1}{50}$; $\frac{1}{60}$; $\frac{1}{70}$; $\frac{1}{80}$; $\frac{1}{90}$; $\frac{1}{100}$; $\frac{1}{120}$;

$\frac{1}{140}$; $\frac{1}{160}$; $\frac{1}{180}$

2 gouttes de chaque dilution

Antigène 1 goutte

Solution T.V. 1 goutte

Après une heure au bain-marie à 37°C on ajoute :

2 gouttes de mélange à parties égales d'hématies de mouton en suspension à 2 % et du sérum hémolytique dilué au 1/1800. Ce mélange doit être préparé 10 minutes avant l'usage.

Après 30 minutes au bain-marie à 37°C on lit les résultats. L'unité de complément est donnée par la dilution qui provoque une hémolyse totale. On utilise pour la réaction deux unités dans 2 gouttes de complément.

Pour contrôler la réaction on fait des témoins : On utilise la même procédure sans mettre de l'antigène substitué par une goutte de T.V.

REACTION :

Le principe de la réaction est la fixation à chaud... Le système antigène, complément et anticorps se fixe pendant le séjour au bain-marie à 37°C pendant une heure.

On prépare les dilutions de sérum $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$,

$\frac{1}{128}$... plus un tube pour faire le témoin sérum (recherche du pouvoir anticomplémentaire du sérum au $\frac{1}{8}$), ainsi que les témoins généraux (6 tubes) pour contrôler le système hémolytique utilisé et pour vérifier si le complément est bien présent à 2 unités et si l'antigène n'a pas de pouvoir anticomplémentaire (voir schéma de la réaction de fixation du complément).

La meilleure méthode de diagnostic consiste à déceler le taux des anticorps fixant le complément dans le sérum "précoce" prélevé 1-3 jours après la manifestation de la maladie, et le sérum "tardif" prélevé entre le 10°-14° jour. En cas d'infection grippale le titre du sérum "tardif" doit être quatre fois plus élevé que celui du sérum "précoce".

Notre enquête porta sur 87 sérums humains provenant de personnes susceptibles d'avoir été infectées par un virus

SCHEMA DE LA REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT

[illegible]

FIXATION DU COMPLEMENT

Nombre de
cas

40

30

20

10

<8

8

16-32

>64

Titre



grippal (moitié sud de la France).

Titre	Nombre de cas	%
< 8	11	12,62
8	12	13,79
16 - 32	33	37,89
≥ 64	31	35,70

N° de sérum	Nom et prénom	N° jour	Titre
1	N.. P..	1	128
2	"	16	512
3	Pau.	1	0
4	"	8	128
5	Fr..	2	0
6	"	6	16
7	N...	2	0
8	"	14	128
9	B. Ch..	2	16
10	Guo	3	128
11	Ka...	3	8
12	"	14	64
13	"	24	16
14	Con..	4	0
15	"	10	128
16	So...	4	32
17	"	13	16
18	"	33	16
19	Re...	4	0
20	"	19	64
21	"	31	128
22	"	45	128
23	Car..	5	32
24	"	15	16
25	Cond...	5	64

N° de sérum	Nom et prénom	N° jour	Titre
26	Sa..	6	32
27	Ser..	7	128
28	Ou...	7	32
29	Nac..	9	32
30	Br..	9	32
31	Vill	9	0
32	"	13	64
33	Mar..	10	128
34	Mim.	0	32
35	GOM..	10	16
36	Di..	11	16
37	Port..	11	128
38	Chap.	12	128
39	"	20	64
40	"	34	16
41	Ro..	13	128
42	"	24	64
43	"	36	64
44	"	46	64
45	"	50	32
46	Du...	14	32
47	Dug..	15	128
48	Azor.	16	64
49	"	33	32
50	Piq..	30	64

Titre des sérums précoces et tardifs.

Le tableau rassemblant les résultats concernant les sérums précoces et tardifs nous montre que les premiers jours les titres furent généralement bas , mais qu'ils commencent à augmenter à partir du 3ème jour, le maximum étant situé entre le 8ème et le 16ème jour pour la majorité des cas, les titres allant ensuite en décroissant.

On peut voir une différence entre les sérums d'enfants qui ont un titre bas et ceux des adultes qui ont déjà été en contact avec la grippe.

Il est dommage que tous les sérums n'aient pas été prélevés en tenant compte des jours pour suivre le cours de la maladie. Nous avons souvent reçu des sérums après 12 jours de maladie sans en connaître l'historique.

Cependant nous avons pu établir les modalités d'évolution des anticorps grâce à deux sérums "précoce" et "tardif" bien qu'il n'y ait pas eu assez de sérum pour suivre le développement de la maladie.

II - INHIBITION D'HÉMAGGLUTINATION

1°) Hémagglutination virale :

HIRST et Mc CLELLAND et HARE ont remarqué en 1941 que les hématies de poule étaient agglutinées par le liquide d'oeuf embryonné infecté avec différentes souches de virus grippal. HIRST en 1942 détermina que l'hémagglutination était identique à la particule infectieuse.

ANDERSON a fait une classification d'hémagglutinines en fonction de leurs propriétés. Les hémagglutinines du myxovirus de la grippe classé dans le premier groupe sont "liées à la particule virale et provoquent la destruction du récepteur mucoprotéique de l'hématie du fait de l'intervention d'une enzyme".

La méthode d'hémagglutination sert à déterminer le titre du virus. Elle est de HIRST et SALK. Au laboratoire d'Hygiène nous utilisons la méthode de SALK modifiée. Le principe de réaction est le suivant : des dilutions croissantes de virus sont mises en contact avec une suspension d'hématies sensibles.

Pour effectuer la réaction d'hémagglutination du virus grippal, il faut :

- dilution du virus
- solution tamponée dite "Salk"
- les hématies de poule
- Matériel : plaques, pipettes de Svedmyr, seringue de répartition.

Hémagglutinine :

On utilise généralement les liquides allantoïque ou amniotique d'oeuf embryonné ou encore les cultures sur rein de singe dont on emploie le surnageant. Les antigènes sont conservés à 4°C.

Hématies :

Pendant nos travaux nous avons utilisé des hématies de poule. Le prélèvement peut être effectué par ponction de la veine des ailes, mais nous avons utilisé le sang provenant d'un abattoir de volailles.

Le sang fut prélevé en solution d'Alsever directement dans un flacon gradué. Le mélange est fait à volume égal sang

et solution d'Alsever.

Dextrose anhydre	20,05 g
NaCl	8,00 g
Citrate trisodique 5 H 20	4,20 g
Eau distillée	1000 ml

Le pH doit être ajusté à 6,1 avec de l'acide citrique en solution à 5 %.

Stérilisation par tyndalisation 3 jours de suite à 100° pendant 30 minutes.

La suspension d'hématies utilisée pendant toutes les réactions d'hémagglutination et d'inhibition d'hémagglutination est constituée par le culot d'hématies à 0,75 % dans la solution tampon dite "Salk". On utilise la même solution pour le lavage. Les hématies sont préalablement lavées trois fois et centrifugées trois fois 3000 tours/minute pendant 10 minutes.

Solution "Salk" (solution mère)

NaCl	85,0 g
Monophosphate de K	6,8 g
NaOH	1,5 g
Eau distillée q.s. ...	500 ml

La solution de Salk doit être préparée ad hoc. Le mélange (950 ml d'eau distillée avec 50 ml solution "mère") donne une solution physiologique d'un pH 7,1-7,2. On prend toujours de l'eau distillée sur verre pour empêcher l'influence des traces de cuivre sur la sensibilité de l'hémagglutination.

Matériel :

La manière classique était de faire l'hémagglutination dans des tubes (Hirst 1941 - Salk 1947) mais en 1948 Salk a proposé des plaques à godets. Au laboratoire d'Hygiène on utilise des plaques de PERSPEX produites par MECALVIGOR (made in England). Ces plaques sont en plastique 18 x 14,5 cm, contenant 80 trous à fond rond. Chaque trou a un volume d'environ 1 cm³.

Les liquides sont répartis à l'aide d'une seringue de répartition "HIFA" (made in Sweden). Les pipettes proposées par Svedmyr en 1949 sont démontables et spécialement fabriquées pour que l'on puisse les utiliser dans des seringues.

Technique de titrage : Sur la plaque on met :

- 0,2 ml de la solution Salk dans tous les trous
sauf dans le 1er
- 0,2 ml de virus dans le 1er trou et le 2ème et
puis on fait un passage

On ajoute partout 0,2 ml de Salk

On ajoute des hématies de poule en suspension à 0,75 % en solution Salk.

On laisse en contact 1 H 30 à la température du laboratoire. La lecture est faite après ce temps d'incubation qui permet la sédimentation des hématies dans le fond sphérique du trou. Elle peut être effectuée par l'oeil nu ou bien au photomètre proposé par Millett et Stanley, Hirst et coll. Cette dernière méthode est convenable pour la réaction dans les tubes mais pas sur plaques.

2°) Inhibition d'hémagglutination

Cette réaction permet de déceler les anticorps spécifiques inhibiteurs de l'hémagglutination.

Avec l'aide de cette réaction nous pouvons voir le titre des anticorps au cours d'une maladie virale. Elle sert également comme méthode d'identification des sous-types de virus grippal.

- Inhibiteurs d'héماغglutination

Les anticorps inhibiteurs apparaissent après une infection ou après une vaccination avec différents types de virus grippal. Les anticorps inhibiteurs spécifiques sont stables à 65°C pendant 30 minutes. Un contact avec du RDE ou avec une concentration modérée de périodate ne les détruit pas.

D'un autre côté nous avons aussi dans les sérums humains et animaux des inhibiteurs non spécifiques qui sont une grande gêne et une cause d'erreur. Plusieurs auteurs ont décrit ce phénomène (Hirst 1942, 1943) dans le sérum normal de lapin et de furet qui inhibe l'héماغglutination avec un virus frais. Beveride et Lind (1946) ont trouvé dans le liquide allantoïque et dans le sac amniotique une suspension d'inhibiteurs du virus des oreillons. Burnet et Mc Crea ont trouvé en 1946 que le sérum de furet exerçait une petite force d'inactivation contre une souche de grippe A (BELL) cultivée soit sur oeuf, soit sur souris.

En 1951 CHU a décrit un inhibiteur thermolabile dans le sérum de souris. C'est une α -globuline, qui se combine avec un virus vivant sans être détruit. Mc Crea a précipité l'inhibiteur de ce type avec une solution de NH_4SO_4 à 33 %. Anderson avait détruit cet inhibiteur par un traitement du sérum normal

humain avec du RDE brut. Il n'est pas détruit par le KIO_4 mais par la trypsine. Il est présent dans les sérums, dans le poumon du furet, dans l'oeuf embryonné. On l'a appelé aussi l'inhibiteur B.

L'inhibiteur "mucoside" ou l'inhibiteur α a été décrit par Francis en 1947. Il n'est pas présent seulement dans le sérum (Mc Crea) mais aussi dans les diverses sécrétions humaines, la salive (Francis et Minuse), l'urine (Tamm and Horsfall) et les larmes (Anderson). On peut aussi le trouver dans la membrane et le liquide allantoïques (Gotschalk et Linde).

Les inhibiteurs α n'ont pas une grande action sur les virus des types A et B non chauffés, mais ils inhibent fortement les virus chauffés. L'activité d'inhibition peut être détruite par le RDE, la trypsine, mais avec le périodate il reste toujours une très petite concentration d'inhibiteurs non détruite. C'est un acide sialique qui serait en compétition avec une neuraminidase normale.

Encore quelques mots sur le troisième groupe d'inhibiteurs décrits par Beylavin et Cohen en 1962. Ils sont présents dans le sérum de cobaye, de lapin et de cheval. Ils se trouvent dans la fraction γ globulinique. Ils sont thermostables

et ils résistent au RDE mais ils sont détruits par le périodate. Ils peuvent supprimer le pouvoir infectieux du virus A₂.

Méthodes de traitement des sérums pour éliminer les inhibiteurs non spécifiques.

Méthodes proposées par l'O M S :

1°) Méthode avec périodate : Il est établi qu'une solution de périodate de potassium KIO₄ 1/90 détruit les inhibiteurs.

A un volume de sérum ajouter 3 volumes de la solution KIO₄, bien mélanger et laisser en contact 15 minutes à la température du laboratoire. Pour neutraliser l'activité du périodate on met en contact avec une solution de glycérol à 1 % dans du soluté physiologique. Il est important que la solution de KIO₄ soit préparée ad hoc et qu'elle ait été obtenue sans chauffage. KIO₄ donne de meilleurs résultats que NaIO₄.

2°) Méthode avec trypsine : On utilise une solution de trypsine Difco : 250 80 mg/l. On met 1/2 volume de celle-ci de sérum. La désactivation se fait au bain-marie à 56°C. La dilution de la trypsine doit être préparée ad hoc.

3°) Traitement avec CO_2

Dans l'appareil de Kipp on met en contact HCl et Ca CO_3 . Dans le CO_2 libéré on fait barboter le sérum, qui est dilué au 1/10ème avec de l'eau distillée. La procédure dure 5 à 10 minutes jusqu'à l'apparition d'un trouble intense. Le sérum est centrifugé pendant 10 minutes à 1500-2000 tours/minute puis on ajoute à chaque fraction de 0,9 ml de liquide surnageant 0,1 ml de solution NaCl à 85 % pour rétablir la concentration physiologique en sels. La méthode est utilisable pour la destruction des γ inhibiteurs dans le sérum de cheval.

Le CO_2 précipite les inhibiteurs non spécifiques, les anticorps spécifiques demeurent dans le surnageant.

4)° - Receptor destroying enzym (RDE)

La souche de *V. Cholerae* 4Z (Burnet et Stone) est cultivée dans un milieu nutritif gelosé renfermant 2 % de gelose et 2 % de peptone pH 7,6. Comme le pouvoir de production d'enzyme est inconstant et peut décroître dans la série des repiquages les cultures obtenues par repiquage qui produisent une quantité importante d'enzyme doivent être lyophilisées.

La culture mère est constituée par une culture de 6 à 8 heures dans un milieu avec 2 % de peptone (pH 6,9). A partir

de cette culture, on ensemence des boîtes de gelose contenant 0,8 % de gelose et 2 % de peptone.

On les met à l'étuve pendant 16 heures. La surface de la gelose est raclée et la récolte filtrée à travers une gaze stérile. Le liquide ainsi obtenu est filtré sur un filtre EKS. Le Ph final du filtrat ne doit pas dépasser 7,6. On le conserve dans des ampoules sous forme lyophilisée. On le contrôle par deux manières :

- 1 - Contrôle et titrage du pouvoir destructeur des récepteurs des hématies
- 2 - Contrôle de suppression d'inhibiteurs non spécifiques

1 - Contrôle et titrage du pouvoir destructeur des récepteurs :

On utilise du sang de poule recueilli sur liquide d'Alsever. Les hématies sont lavées trois fois dans la solution physiologique tamponnée boratée (pH : 7) suivante :

H_3BO_3		1,205 g
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$		0,052 g
$CaCl_2$		1, 0 g
$NaCl$		9,0 g
eau distillée	..q.s.	1000 ml

On fait la dilution de 0,2 ml de RDE de 1/2 en 1/2 dans 15 tubes et on ajoute ensuite 0,2 ml d'hématies à 1 % en suspension.

Après agitation on les met au bain-marie pendant une heure 30. On peut remarquer quelquefois une hémagglutination dans les fortes concentrations, parce que le RDE a un pouvoir d'agglutination non spécifique. Après la lecture on ajoute 0,02 ml soit 10 unités d'un virus grippal. On laisse en contact 1 H au bain-marie à 37°C et on effectue la lecture.

Titrage du virus : Pendant le contact RDE-hématies on fait le titrage du virus. On prend 10 tubes avec 0,2 ml de virus dans le premier et on fait un passage de 1/2 en 1/2. On ajoute 0,2 ml de GR et on laisse en contact à 37°C au bain-marie pendant une heure.

Après avoir lu le titre on calcule les unités de virus
Par exemple :

Le titre d'hémagglutination était 160 dans 0,2 ml

$\frac{1}{160}$ dans 0,2 ml

ou $\frac{1}{16}$ dans 0,02 ml ce qui fait une unité

et $\frac{1}{1,6}$ dans 0,02 ml équivalent à 10 unités.

Le RDE agit sur les récepteurs d'hématies et les détruit. Si les récepteurs sont détruits, nous avons une certaine

inhibition, alors que l'hémagglutination apparaît dans une dilution plus élevée d'enzyme de vibrion cholérique.

Nous avons utilisé plusieurs fois cette réaction, mais avec un résultat non satisfaisant. Les titres furent toujours très bas. Le sang, comme nous l'avons déjà dit plus haut, était prélevé sur solution d'Alsever.

Stone a remarqué que l'action du RDE était plus grande en présence d'ions Ca (environ 0,1 % de CaCl_2 dans l'eau physiologique).

Burnet et Stone ont prouvé aussi que le pH jouait un certain rôle (tableau I). Ils ont eu le titre le plus élevé (1280) en présence de M/100 Ca^{++} à pH 6,5.

Ils ont étudié quels étaient les facteurs de variation du titre : si le pH est maintenu à 7,2 et si l'on fait varier la concentration de Ca^{++} de M/0 $\rightarrow$ M/400. Les meilleurs titres sont observés aux concentrations de M/200 et M/100.

Influence de la composition du solvant sur le titre du R.D.E.

pH	Ca	autres constituants	Titre
5,6	N/100	acétate	480
5,9	N/100	acétate	1 000
6,5	N/100	acétate	1 280
7,0	N/100	borate	1 000
7,2	-	eau	280
7,2	N/400	eau	1 600
7,2	N/200	eau	1 600
7,2	N/100	eau	1 400
7,2	N/50	eau	1 280

D'après Burnet et Stone Austr. Journ. of Exp. Biol. Med. Sci.
1947 - 25.227

On a remarqué que le titre du RDE était abaissé quand il était en contact avec certains corps en solution. On a étudié le titre d'activité du RDE dans l'eau physiologique, l'influence favorable du CaCl_2 , mais les sels de potassium et de sodium provoquent une baisse du titre (voir tableau ci-après).

Effets du Ca^{++} et du Ca^{++} désionisant sur le RDE

Concentr.	Diluents	TITRE
normal	eau physiologique	320
M/100	CaCl_2	1 200
M/50	Na - citrate	5
M/20	K - oxalate	15
M/10	Na F	240
M/30	Na phosphate	160
M/60	Na Hexametaphosphate	< 5

Tableau 2

D'après Burnet et Stone
Austr. Journ. of. Exp. biol. Med Sci. 1947. 25-227

Sur la base de ces observations nous avons effectué le titrage, dont nous avons décrit la technique plus haut. Comme virus nous avons utilisé la souche $\text{A}_2/\text{Singapour}/4/57$. Le sang de poule fut prélevé de deux manières :

- 1°) Sur solution d'Alsever
- 2°) Sur perles de verre,

puis lavé simultanément en solution Salk et en solution tamponnée boratée, puis mis en suspension à 1 % dans les mêmes solutions.

Solution	GR perle	GR ALSEVER
Sol. tamponnée boratée	256	0
Sol. SALK	64	0

En regardant les résultats du tableau ci-dessus, nous pouvons tirer 3 conclusions :

- 1 - Les ions Ca présents dans la solution tamponnée boratée sous forme de CaCl_2 favorisent l'action du RDE.
- 2 - Le citrate de sodium, contenu dans la solution d'Alsever semble empêcher complètement l'action du RDE, c'est-à-dire la destruction des récepteurs des hématies.
- 3 - L'influence du KH_2PO_4 contenu dans la solution Salk baisse le titre du RDE.

Comme nous pouvons le voir cette expérience a confirmé le travail de Burnet et Stone.

Pour éviter toute erreur et obtenir de bons résultats dans la réaction de titrage du RDE quant au pouvoir destructeur des récepteurs d'hématies on devrait utiliser :

- 1°) du sang de poule prélevé sur perles de verre
- 2°) Solution tamponnée boratée

2 - Contrôle de suppression d'inhibiteurs non spécifiques

Philip Duphar contrôle la suppression d'inhibiteur de la manière suivante. Le sérum normal de furet est utilisé. Une partie du sérum est mise en contact avec 5 parties de RDE. On laisse ce mélange pendant une nuit à 37°C, puis on le chauffe pendant 1 heure à 56°C au bain-marie pour supprimer l'action enzymatique. On effectue alors une inhibition d'hémagglutination en présence des 3 virus grippaux : type A, type A₁, et type A₂* Les résultats sont satisfaisants si les inhibiteurs non spécifiques sont détruits.

* A (1941 Pays-Bas)

A₁ (1947 USA)

A₂ (1963 Pays-Bas)

Les mêmes quantités sont utilisées pour traiter les sérums pour effectuer une inhibition.

Les auteurs ont cependant des opinions différentes quant aux moyens à utiliser pour détruire les inhibiteurs non spécifiques. Jensen pense que l'utilisation du KIO_4 est toujours acceptable, si le RDE et la trypsine se montrent inactifs. Il a fait des essais en combinant la trypsine et le périodate de potassium parce que la trypsine digère les inhibiteurs qui se combinent avec les hémagglutinines des autres types A et B, alors que le périodate est actif contre les inhibiteurs de la souche asiatique.

Au laboratoire National de la grippe à Lyon, nous avons étudié les inhibiteurs non spécifiques dans les différents sérums et nous les avons traités par deux méthodes.

- Traités par le RDE (produit Philips-Duphar)
 - 1 volume de sérum
 - 5 volumes de RDE
- Traités par la méthode de Jensen, modifiée par Davenport :
 - 1 volume de sérum est mis en contact avec 1 volume de solution de trypsine. Ce complexe est mis au bain-marie + 56°C pour 30 minutes. Après avoir abaissé la température

à la température du laboratoire on ajoute 3 volumes de KIO_4 M/90 et on laisse en contact 15 minutes, on ajoute alors 3 volumes d'une solution de glycérol à 1 % dans l'eau physiologique. La solution de trypsine est préparée avec de la trypsine Difco 1 : 250 qui est dissoute dans une solution de phosphate M/10 pH 8,2. L'agitation est recommandée avec agitateur magnétique.

- Les sérums non traités.

Sérums

B anti Johannesburg	ser. de furet 1
B anti Fratella	ser. de furet 101
anti SV5	ser. de lapin 32-32-7
B anti Soulard	ser. de furet 1646
A anti Singapour	ser. de furet 1994
A anti Cayssiol	ser. de furet 2042
B anti Ruguet	ser. de furet 100
Sérum de furet normal	101
Sérum normal de lapin	15-7

Virus

B/Johannesbourg/33/55
B/Lyon/2/65
B Fratella G. B/Lyon/1/66

LES INHIBITEURS NON SPECIFIQUES

NT - Non traité

RDE - Traité par RDE

TRY - Traité par trypsine.

Sérum	Virus	B Johanesburg B/Joh./33/55			B Soulard B/Lyon/2/65			B Fratella B/Lyon/1/66			B Redjem B/Lyon/8/66			A ₂ Ruguet A ₂ /France/51/63		
		NT	TRY	RDE	NT	TRY	RDE	NT	TRY	RDE	NT	TRY	RDE	NT	TRY	RDE
Johanesburg Furet 1 22.12.64	B	<u>320</u>	<u>160</u>	<u>320</u>	<u>320</u>	160	80	160	80	40	320	40	40	160	10	<10
SV 5 Ser de lapin 32-32-7 12.10.65		<10	<10	<10	160	160	20	160	40	80	320	40	320	320	<10	40
FRATELLA Furet 1 15.3.66	B	80	40	20	160	160	40	<u>160</u>	<u>320</u>	<u>160</u>	160	40	40	80	<10	<10
Soulard Furet 1646 17.5.65	B	640	160	320	<u>640</u>	<u>640</u>	> <u>1280</u>	640	320	640	80	40	40	160	10	<10
Singapour Furet 1994 9.8.65	A ₂	<10	<10	<10	40	20	<10	20	<10	<10	<10	<10	<10	640	80	160
Cayssiols Furet 2042 20.10.65	A ₂	<10	<10	<10	40	10	<10	20	<10	<10	<10	<10	<10	640	> <u>1280</u>	> <u>1280</u>
Ruguet Furet 100 10.3.66	A ₂	<10	<10	<10	40	40	<10	10	40	<10	10	<10	<10	<u>2560</u>	<u>2560</u>	<u>2560</u>
Ser Furet normal Furet 101 1.3.66		<10	<10	<10	20	20	<10	10	20	<10	<10	<10	<10	160	40	10
Ser lapin normal 15-7 (o) 31.5.65		10	10	<10	40	10	10	40	10	20	10	<10	<10	80	40	10

B Redjem B/Lyon/8/66

A₂/FRANCE/51/63

Nous avons utilisé 7 sérums de furet (1 normal 3 anti B et 3 anti A₂) et 2 sérums de lapin (1 anti SV5 et 1 normal) et 4 types de virus B dont 2 souches isolées pendant la dernière épidémie 1966 et 1 virus de type A₂.

Chaque sérum fut traité par le RDE et par la méthode combinée trypsine KIO₄ (Jensen modifié par Davenport). La réaction d'inhibition d'hémagglutination fut effectuée par la technique habituelle avec une suspension à 0,75 % hématies de poule.

D'après les résultats obtenus nous avons pu constater une meilleure action du RDE comparée à celle de la trypsine, si ce n'est pour le sérum de lapin anti SV5 où la trypsine a une action nettement supérieure.

Pour voir l'action du RDE sur les inhibiteurs non spécifiques dans le sérum de furet normal, nous l'avons mis en contact après 3 différents traitements avec les sous-types suivants de la grippe A :

type A	PR8
type A ₁	A ₁ /Lyon/52/57 dit "Roybin"
type A ₂	A ₂ /FRANCE/51/63 dit "Ruguet"

Nous avons vu plus haut la méthode de Philips-Duphar pour le contrôle du RDE. Nous avons utilisé la même méthode, seulement nous avons traité le même sérum avec la combinaison de trypsine et périodate (Jensen ; Davenport). Nous avons comparé ces sérums différemment traités avec du sérum normal de furet non traité.

SERUM DE FURET NORMAL

:	:	:	:	:
:	A	A ₁ /	A ₂ /	:
:	PR8	Lyon/32/57	FRANCE/51/63	:
:	:	:	:	:
:Sérum non	:	:	:	:
traité	80	40	160	:
:	:	:	:	:
:Sérum avec	:	:	:	:
TRYPSINE	40	<10	40	:
:	:	:	:	:
:Sérum avec	:	:	:	:
RDE P-045	<10	<10	10	:
:	:	:	:	:

Comme nous le voyons ci-dessus le RDE a détruit complètement les inhibiteurs ce qui n'est pas le cas pour la combinaison trypsine-périodate.

Réaction d'inhibition d'hémagglutination :

La réaction comporte une hémagglutination préalable d'hémagglutinine, un traitement des sérums à expertiser pour supprimer les inhibiteurs non spécifiques et pour empêcher l'hémagglutination d'une autre espèce, que celle d'où provient le sérum à expertiser et enfin la réaction où on met en contact d'abord la dilution de sérum avec l'hémagglutinine puis avec les hématies de poule.

Titrage d'hémagglutinine : Il existe deux techniques celle de Salk et celle du Comité d'experts de l'OMS. Nous utilisons cette dernière avec quelques modifications. Le volume utilisé est de 0,2 ml, le solvant est la solution de Salk. Nous prenons comme unité d'hémagglutination 0,2 ml de la dilution d'antigène capable d'agglutiner 50 % de la suspension de globules rouges. Si par exemple cette dilution était au 1/320 nous prenons comme antigène d'épreuve d'inhibition 4 unités, c'est-à-dire la dilution d'antigène au 1/80.

Traitement du sérum : Les sérums sont conservés à - 20°C. Ils sont inactivés au bain-marie à 56°C pendant une demie-heure avant usage.

Pour chaque réaction d'inhibition il faut prendre les sérums à expertiser et le sérum de référence correspondant

à chaque antigène qui participera dans la réaction et qui permet de la vérifier.

Les sérums sont traités d'abord avec les différents moyens (RDE, trypsine, KIO_4 , etc...) pour supprimer les inhibiteurs non spécifiques.

Ensuite on traite les sérums avec 0,1 ml de suspension d'hématies lavées et diluées à 50 % pour se débarrasser des hémagglutinines "anti-espèces".

Technique de la réaction :

- Mettre 0,2 ml de solution de Salk dans chaque trou sauf le premier.

- Mettre 0,2 ml de sérum dilué dans le premier et le deuxième trou et faire un passage. On jette la dilution restée dans le rhéomètre.

- Ajouter 0,2 ml de dilution de virus contenant 4 unités dans chaque trou.

On laisse en contact pendant une heure à la température du laboratoire.

On ajoute 0,4 ml d'hématies de poulet préparées comme nous l'avons déjà indiqué plus haut.

On laisse 1 H 30 à la température du laboratoire et on effectue la lecture. Nous avons pris comme dilutions inhibant l'hémagglutination tous les résultats inférieurs à $1/4$ (50 %).

Comme témoins on doit faire :

1 - Contrôle des 4 unités pour prouver que la dilution du virus contient 4 unités.

On fait la réaction d'hémagglutination dans les cinq trous avec la dilution du virus utilisé dans la réaction :

2 - Témoin du sérum : On met en contact

0,2 ml du sérum, 0,2 ml de solution
de Salk et 0,4 ml de suspension
d'hématies

pour prouver que les sérums ont été bien traités en ne provoquant pas d'hémagglutination.

3 - Témoin d'hématies : pour contrôler la sédimentation des hématies on ajoute à 0,4 ml de solution de Salk 0,4 ml de suspension d'hématies.

RESULTATS :

Il est nécessaire pour faire le diagnostic de la grippe de disposer de deux sérums, un "précoce" prélevé au début de la maladie le 1^{er}-3^e jour et un sérum "tardif" pris entre le 10^e-14^e jour de la maladie. Le titre de ce dernier doit être au moins 4 fois supérieur à celui du sérum "précoce". Etant donné que les inhibiteurs non spécifiques peuvent avoir une influence sur le résultat, ils doivent être supprimés par une méthode convenable.

Les anticorps inhibants qui apparaissent généralement parallèlement aux anticorps neutralisants sont quelquefois avant ou après les anticorps fixant le complément.

La réaction d'inhibition d'hémagglutination peut être négative chez des sujets cependant atteints de la grippe si nous n'engageons pas le virus en cause. Ceci peut arriver au début d'une épidémie ou si un nouveau sous-groupe ou une nouvelle variante empêche d'obtenir de bons résultats, car il faut quelque temps pour isoler le virus responsable.

Les enquêtes épidémiologiques peuvent être effectuées lorsqu'on dispose des souches intervenues dans une population. Pour l'enquête il suffit d'obtenir un sérum de chaque malade.

L'enquête présentée ici fut effectuée sur 87 sérums humains qui furent prélevés pendant l'épidémie 1965. En principe ce sont des sérums de malades qui habitent des communautés : maisons de vieillards, maisons d'enfants, hôpitaux dans le Sud de la France.

Les sérums ont été traités par le RDE et mis en réaction avec 3 virus :

A_2 /Singapour/4/57 comme la première souche de type A_2
 A_2 /Leningrad/29/65 comme une variante
 A_2 /Lyon/4/65 dite "Cayssiols" comme le virus en cause

Le tableau sur les rapports entre le nombre de cas et les titres d'inhibition d'hémagglutination nous montre que les titres les plus élevés sont :

pour le type A_2 /Leningrad/29/65	titre 160-320	31 cas
type A_2 /Singapour/4/57	titre $\geq$ 5120	19 cas
type A_2 /Lyon/4/65	titre $\geq$ 5120	20 cas

La comparaison entre les souches A_2 /Singapour/4/57 et A_2 /Lyon/4/65 nous a montré que dans les 3 cas le titre de Singapour était 4 fois plus élevé.

RAPPORTS ENTRE LE NOMBRE DE CAS ET LES TITRES D'INHIBITION D'HEMAGGLUTINATION

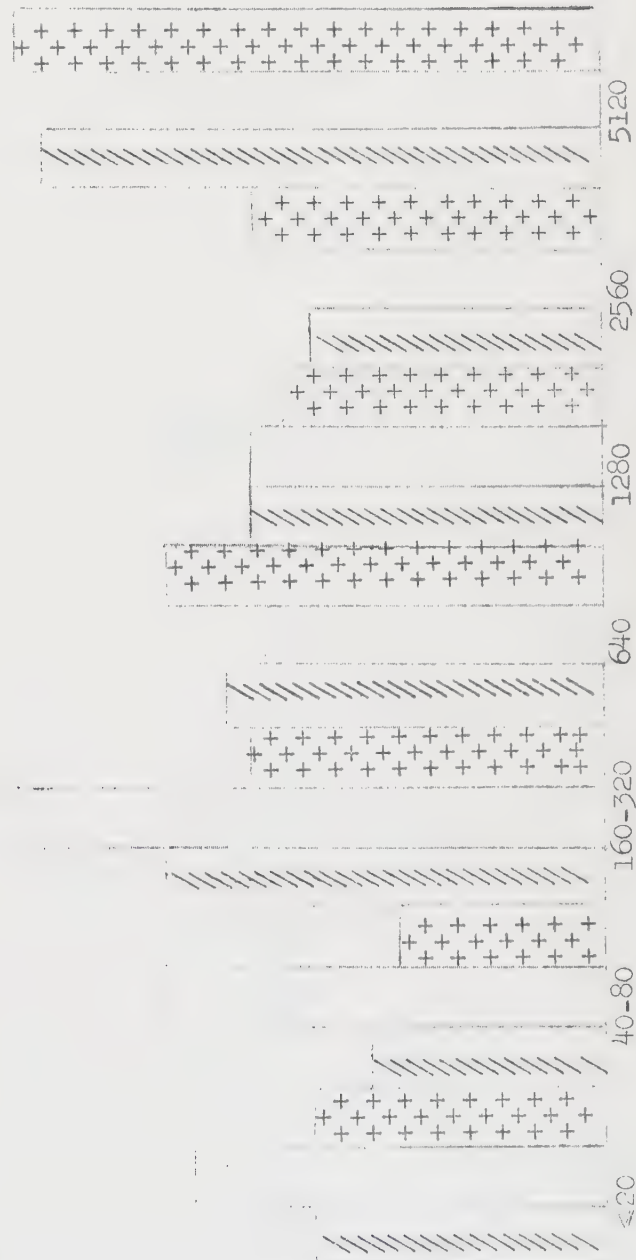
A₂/Singapour/4/57

A₂/Léninegrad/29/65

/Cayssiols/

A₂/Lyon/4/65

Nombre de
cas



Titre d'inhibition d'hémagglutination

	A ₂ /Singapour/4/57	A ₂ /Lyon/4/65
VIE..	640	20
VILL..	2 560	< 10
Sc... E...	320 ser. précoce:	40
	2 560 ser. tardif	60

Le titre du Cayssiols (A₂/Lyon/4/65) était 4 fois plus élevé que A₂/Singapour dans les 11 cas.

Patient	A ₂ /Singapour/4/57	A ₂ /Lyon/4/65
SA... M...	10	> 5 120
GOU... M..	80	640
BLON... P..	< 10	160
VAL...	< 10	40
SC... O.	1 280	< 5 120
NOV... P..	320	< 5 120
LE... L..	640	< 5 120
BO... C...	160	640
PR... G..	640	2 560
BAU... C...	160	640
PIQ... I...	20	160

Nous avons parlé plus haut de l'importance du prélèvement des sérums "précoce" et "tardif" pour le diagnostic. Voici quelques résultats qui nous montrent l'augmentation des anticorps fixant le complément et les anticorps inhibiteurs.

Patient	Nombre de jours de maladie	Fix. du comp. A ₂ Singapour/ 4/57	I. H A		
			Singap. ^x	Lening. ^{xx}	Cayss. ^{xxx}
SC.. E..	11	0	320	10	40
	21	8	2 560	160	640
DJ.. DJ.	1	0	160	40	20
	12	32	5 120	10	5 120
RE.. JE..	4	0	40	10	40
	19	64	80	20	160
	31	128	320	80	640
	45	128	640	160	320
EV.. M.	4	0	10	10	10
	8	16	80	20	80

x A₂/Singapour/4/57

xx A₂/leningrad/29/65

xxx A₂/Lyon/4/65

C O N C L U S I O N S

Le but de notre travail était d'étudier les problèmes posés par le diagnostic biologique de la grippe à virus A2, en tenant compte des observations faites au cours de l'épidémie qui a sévi en France en 1965.

Après un rappel des données épidémiologiques sur l'évolution de la grippe A2 dans le monde, et en particulier en France, nous avons étudié toutes les techniques biologiques mises en oeuvre pour son diagnostic au Centre National de la Grippe de Lyon.

Nous avons procédé à l'étude détaillée des méthodes de prélèvements et d'envoi de produits pathologiques, puis à l'étude des cultures de virus sur cultures cellulaires et sur oeufs de poule embryonnés.

Ainsi, a été possible une étude comparée sur la sensibilité des deux méthodes d'isolement, laquelle a fait apparaître la supériorité des cultures cellulaires pour l'isolement et l'intérêt de la culture sur oeufs embryonnés pour obtenir par passages de plus grandes quantités de virus pour les études d'identification.

Les techniques d'étude de l'identification du type et du sous-type et des variants des souches isolées en 1965 ont été exposées. Les résultats obtenus au Centre National de la Grippe ont été indiqués, ainsi que ceux fournis par le Centre

Mondial de la Grippe de Londres. Nous avons, en particulier, étudié comparativement les méthodes de l'inhibition de l'hémagglutination et celle de fixation du complément anti-virale avec des sérums préparés contre le virus purifié dans le but d'identifier les sous-types.

Une étude sérologique a été effectuée en mettant en oeuvre les réactions de l'inhibition de l'hémagglutination et de fixation du complément. Pour la réaction de l'inhibition de l'hémagglutination, nous avons étudié en particulier les méthodes permettant de supprimer les inhibiteurs non spécifiques.

87 sérums de malades ont été étudiés par les deux méthodes et les résultats ont été présentés, en utilisant comparativement pour l'épreuve de l'inhibition de l'hémagglutination les souches A2/Singapour/4/57, A2/Leningrad/29/65, A2/Lyon/4/65.

De l'ensemble de cette étude, il ressort que les méthodes d'isolement et d'identification des virus grippaux et les techniques sérologiques ont été notablement améliorées. Des progrès restent à faire, cependant, en ce qui concerne l'identification des variants.

Président de la thèse :
Professeur R. SOHIER

VU et permis d'imprimer
LYON, le 15 Juin 1966

VU, le Doyen :
J.F. CIER

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,
P. LOUIS

R E S U M E

Après une introduction sur l'importance de la grippe en tant que maladie épidémique et pandémique, ce travail comporte un premier chapitre contenant une étude d'évolution de la grippe dans le monde et en France, une description d'organisation des centres de références de la Grippe institués par l'Organisation Mondiale de la Santé. Les différentes modalités de prélèvements sont également étudiées, ainsi que l'envoi au laboratoire des produits pathologiques.

Dans le deuxième chapitre, sont étudiés le traitement préalable des prélèvements, l'isolement simultanément sur les tissus cellulaires (rein de singe) et sur oeufs embryonnés ou successivement sur tissu cellulaire puis sur oeuf. L'identification fut effectuée par l'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination et par la réaction de fixation du complément.

Le troisième chapitre rapporte les études sérologiques. Les techniques des réactions de la fixation du complément et d'inhibition de l'hémagglutination sont décrites en détail, ainsi que les différentes méthodes permettant de supprimer les inhibiteurs non spécifiques. Les résultats concernant l'étude de 87 sérums de malades sont présentés.

Ces chapitres sont suivis des conclusions.

BIBLIOGRAPHIE PAR CHAPITRE

CHAPITRE I

EPIDEMIOLOGIE

1 - Relevé épidémiologique hebdomadaire 1965. 40 - 365-380

2 - Rapports à l'O M S du Centre National de la grippe.
Section de Virologie du Laboratoire National de la
Santé Publique. Lyon :

Enquêtes concernant la grippe

Résultats obtenus du 31.1 au 23.2.1965

du 9.2 au 5.3.1965

du 14.2 au 1.3.1965

du 6.3 au 13.3.1965

du 25.3 au 6.4.1965

3 - Circulaire ministérielle n° 71 b du 11.9.1957

4 - Circulaire ministérielle n° 787 du 27 Mai 1965.

5 - Lettre ministérielle du 2 Février 1965 aux Préfets.

6 - R. SOHIER - G. GAUDIN. Rev. Hyg. et Med. Soc. t. 11
1965. n° 3 257-282.

7 - Comité d'Experts des maladies à virus des voies respi-
ratoires. Bull. OMS. Rapp. Techn. 1959 170

CHAPITRE II

ISOLEMENT DES SOUCHES VIRALES

- 8 - TYRRELL (D.A.J.). J. Immunol., 1955, 74, 293
- 9 - MOGABGAB (W.J.), HOLMES (B.) et PELON (W.). J. Infect.
Dis., 1961, 103, 315.
- 10 - HINZ (R. W.) et SYVERTON (J.T.). Proc. Soc. Exper. Biol.
and Med., 1959, 101, L, 19 ; LL, 22.
- 11 - HOLPER (J.C.) et MARQUIS (G.S. Jr.). J. infect. Dis.,
1959, 105, 288.
- 12 - LOFFLER (H.), HENLE (G.) et HENLE (W.). J. Immunol.,
1962, 88, 763.
- 13 - EATON (M.D.), JEWELL (M.) et SCALA (A.R.). Virology
1960, 10, 112.
- 14 - EATON (M.D.) et SCALA (A.R.). Virology, 1961, 13, 300.
- 15 - DALES (S.) et CHOPPIN (P. W.). Virology, 1962, 18, 489.
- 16 - MOGABGAB (W.J.), GREEN (I.J.), DIERKHISING (O.C.) et
PHILLIPS (I.A.). Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.,
1955, 89, 654.

- 17 - SIMPSON (G.I.) et MOGABGAB (W.J.). J. Immunol. 1957, 78, 456.
- 18 - LEHMANN-GRUBE (F.). Arch. ges. Virusforsch., 1964, 14, 177.
- 19 - F. LEHMANN-GRUBE. S. FAZEKAS de Saint-Groth - Archiv für die gesamte Virus forschung, 65 - 17.5 . 534-548.
- 20 - DAVIS (D.J.), PHILIP (R.N.), BELL (J.A.), VOGEL (J.E.) et JENSEN (D.V.), Am. J. Hyg., 1961, 73, 138.
- 21 - TAKEMOTO (K.K.), LYNT (R.K.), ROWE (W.P.), HUEBNER (R.J.), BELL (J.A.), MELLIN (G.W.) et DAVIS (D.J.). Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 1955, 89, 308.
- 22 - ROZEE (K.R.), WILLIAMS (G.L.) et VAN ROOYEN (C.E.). Science, 1958, 128, 591.
- 23 - HEATH (R.B.) et TYRRELL (D.A.J.). Arch. ges. Virusforsch., 1959, 8, 577.
- 24 - SAWICKI (L.) et GRZELAKOWA (H.). Med. Dosw. Mikrobiol., 1960, 12, 241.
- 25 - MOZZICA (G.) et BLANCO (A.B.). Riv. Ist.sieroterap. ital., 1961, 56-312.
- 26 - KALTER (S.S.), CASEY (H.L.), JENSEN (K.E.), ROBINSON (R.Q.) et GORRIE (R.H.). Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 1959, 100, 367.
- 27 - BELL (J.A.), CRAIGHEAD (J.E.), JAMES (R.G.) et WONG (D.C.). Am. J. Hyg.; 1961, 75-84.
- 28 - CHANOCK (R.M.), JOHNSON (K.M.), COOK (M.K.), WONG (D.C.) et VIRGOSKO (A.). International Conference on Asian Influenza Bethesda, 1960, in Am. Rev. Resp. Dis., 1961, 83-125.

- 29 - F.M. DAVENPORT - E. MINUSE. Diagn. procedures for viral and rickettsial diseases. Ann. Public. Health Association 1964.
- 30 - MOGABGAB (W.J.). J. Bacteriol., 1962, 85-209.
- 31 - VOGEL et SHELOKOV - Science 1957 126-358.
- 32 - HOTCHKINS J.E. COHEN S.M., RUSKA H. et RUSKA C. Virology 1958. 6-689.
- 33 - SHELOKOV (A.), VOGEL (J.E.) et CHI (L.). Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 1958, 97-802.
- 34 - FULTON (F.) et ARMITAGE (P.), J. Hyg., 1951, 49-247.
- 35 - FAZEKAS DE SAINT GROTH (S.) et WHITE (D.O.). J. Hyg., 1958, 56-151.
- 36 - EATON (M.D.), ADLER (L.T.) et PERRY (M.E.). Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 1953, 84-57.
- 37 - BARRY (R.D.). Virology, 1961, 14, I, 389 ; II, 398, III, 406.
- 38 - VEERARAGAVAN (N.), KIRTIKAR (M.W.). et SREEVALSAN (T.) Bull. O. M. S., 1961, 24-711.
- 39 - LENNETTE (H.). Am. Rev. Resp. Dis., 1961, 83-116.
- 40 - F.H. BURNET. The British journal of Exp. Pathology. 21-1940 147-153.
- 41 - R.H. TAYLOR. R.J. CHILIVO. P.S.E.B. II. 1942 51-328 330.
- 42 - HIRST G., J. IMMUNOL., 1942, 45-293
- 43 - J.F. ENDERS et LEVENS in Diagnostic Procedures (New York 1948 Am. Pub. Health Assoc. ed. 139.
- 44 - R. SOHLER et I. ESSER-TRILBERGER. Ann. Inst. Pasteur 1952 82-168.
- 45 - LEPINE (P.). Bull. O.M.S., 1953, 8, 683.
- 46 - HOYLE (L.). J. Hyg., 1952, 50-229.
- 47 - LIEF (F.S.) et HENLE (W.). Virology, 1956, 2, 753 et 772.

- 48 - LENNETTE (E.H.) et HORSFALL (F.L. Jr.), J. Exper. Med. 1941 73-581.
- 49 - LIEF (F.S.), FABIYI (A.A.) et HENLE (W.). J. Immunol., 1958 80, 53.
- 50 - FABIYI (A.), LIEF (F.S.) et HENLE (W.). J. Immunol., 1958 81-467.
- 51 - LIEF (F.S.), OSTAPIAK (L.), FABIYI (A.) et HENLE (W.). J. Immunol. 1958 81-478.
- 52 - HENLE (W.) et LIEF (F.S.). J. Immunol., 1960, 84-491.
- 53 - W. HENLE, F. LIEF, A. FABIYI. The Lancet 1958 274-810.

CHAPITRE III

SEROLOGIE

- 54 - R. SCHIER, M.M. PEILLARD. J. GINESTE et J. FREYDIER. Biologie clinique n° 3-4 Mars-Avril 1956.
- 55 - V. SAUTTER et P. LEPINE Ann. Inst. Pasteur 1948 74-261.
- 56 - G. HIRST. Science 1941 94-22
- 57 - L. Mc CLELAND et R. HARE Canad. J. Pub. Health 1941 32-550.
- 58 - S.G. ANDERSON et Burnet et STANLEY 'The viruses' vol. 3 "Animal viruses", New York, Londres 1959 Acad. Press éd.
- 59 - J.E. SALK . J. Immunol. 1944 49-87 Svedmyr Am. J. Clin. Med. 1949 19-693.
- 60 - J.E. SALK Science 1948 108-749.
- 61 - G.K. HIRST et E.C. PICHELIS J. Immunol. 1942 45-273.
- 62 - DRESCHER et LANGE ZENTRALBL. Bact. 1958 173-185.
- 63 - G.L. MILLER et W.H. STANLEY J. Exp. Med. 1944 79-185.
- 64 - G.K. HIRST J. Expert. Med. 1942 75-49

- 65 - G.K. HIRST J. Expt Med. 1945 78-99.
- 66 - J.M. BURNET et J.F. Mc CREA Australian J. Exptl. Biol. Sci. 1946 241.
- 67 - C.M. CHU J. Gen. Microbiolog. 1951 5-739.
- 68 - S.G. ANDERSON Australian J. Biol. Méd. Sci 1948 26-347
- 69 - T. Jv. FRANCIS J. Exper. Med. 1947 851.
- 70 - J.F. Mc CREA Australian J. Biol. Med. Sci. 1946 24-283.
- 71 - T. Jr. FRANCIS et E. MINUSE Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1948 69-291.
- 72 - J. TAMM et F.L. Jv. HORSFAL J. Exp. Med. 1952 95 71.
- 73 - A. GOTTSCHALK et P.E. LINDE Brit. J. Exptl. Pathol. 30-85.
- 74 - G. BEYLAYIN et A. COHEN VIROLOGY 1962 18-144.
- 75 - R. RYKOWSKA et L. SAWICKI MED. DOSW. MIKROBIOL. 1963 5-47.
- 76 - F.M. BURNET et J.D. STONE Australian J. Exp. Biol. Med. Sci 1947 227 25.
- 77 - JENSEN Am. Rev. Resp. DIS 1961 83-120.
- 78 - F. DAVENPORT et E. MINUSE "Influenza viruses" in Lenette Diagnostic procedures for viral and ricketial Diseases Am. public health association inc. 1964.

TABLE DES MATIERES

1	-	Introduction	XIV
2	-	Epidémiologie	1
3	-	Isolement et identification	32
4	-	Sérologie	61
5	-	Conclusion	95
6	-	Résumé	97
7	-	Bibliographie	

